GENOMICA

volumul II

SUB REDACȚIA
PROF. DR. LUCIAN GAVRILĂ

editura enciclopedică

AUTORII ÎN ORDINE ALFABETICĂ:

Ruxandra ACHIM, Gabriela ANTON, Petruța-Pompilia APOSTOL, Aurel ARDELEAN, Nicolai BĂRBĂCAR, Gabriela BORDEIANU, Liliana BURLIBAȘA, Marius CÂRLAN, Ramona CERNAT, Dan CIMPONERIU, Natalia CUCU, Maria DAMIAN, Letiția-Corina DAN, Margareta DUMITRESCU, Lorelai-Bianca GAVRILĂ, Lucian GAVRILĂ, Valeria-Rozalinda GAVRILĂ, Laura-Monica GEORGESCU, Claudia HASSELMANN, Rodica ION, Horia MANIU, Francisc MIXICH, Ionela MOANȚĂ, Rozalia PETCU, Adriana PLEȘA, Luis POPA, Olivia POPA, Rodica REPANOVICI, Irina RADU, Florina RAICU, Maria STRĂUȚ, Rodica TĂLMACI, Gabriela ȚENEA, Alexandru VLADIMIRESCU, Dana UȘURELU

Fiecare autor/autori de capitole poartă întreaga responsabilitate privind rigoarea științifică și utilizarea în condiții legale a surselor de informații.

Această carte a apărut cu sprijinul
Ministerului Educației, Cercetării și Tineretului

ISBN: 973–45–0463–0
ISBN: 973–45–0465–7

575.113.

- genom
- genetică moleculară

GENOMICA

UN TRATAT DESPRE GENOM, DE LA VIRUSURI LA OM

VOLUMUL II

ORGANIZARE ȘI EVOLUȚIE GENOMICĂ

Lucian GAVRILĂ (sub redacția)

CUPRINS

CAPITOLUL I. METODE DE ANALIZĂ A GENOMULUI 1
(Gabriela ANTON, Adraiana PLEŞA, Ruxandra ACHIM, Rodica REPANOVICI)
1. INTRODUCERE 1
2. ANALIZA SPECTROFOTOMETRICĂ 2
3. ELECTROFOREZA 6
4. ANALIZA ENZIMATICĂ 13
    4.1. HIDROLIZA NESPECIFICĂ 13
    4.2. HIDROLIZA SPECIFICĂ 15
    4.3. FINGERPRINTING 17
    4.4. FOOTPRINTING 24
5. HIBRIDIZAREA ACIZILOR NUCLEICI 25
    5.1. CARACTERISTICILE SONDEI MOLECULARE 26
    5.2.MARCAREA SONDELOR MOLECULARE 26
6. REACŢIA DE AMPLIFICARE POLIMERAZICĂ 36
    6.1. PARAMETRII REACŢIEI DE AMPLIFICARE 39
    6.2. VARIANTE DE REACŢII DE AMPLIFICARE 41
    6.3. DECELAREA PRODUŞILOR DE AMPLIFICARE 52
7. SECVENŢIALIZAREA ACIZILOR NUCLEICI 53
    7.1. SECVENŢIALIZAREA ADN 54
    7.2. SECVENŢIALIZAREA ARN 65

CAPITOLUL II. PRODUCEREA DE PROTEINE PRIN TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT (Alexandru ECOVOIU) 69
1. INTRODUCERE 69
2. CLONAREA ŞI EXPRIMAREA UNEI GENE DE INTERES 69
3. VECTORI DE EXPRIMARE UTILIZAŢI PENTRU PRODUCEREA DE PROTEINE PRIN TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT CU AJUTORUL BACTERIEI E.COLI 73
4. PROTOCOALE AUXILIARE UTILIZATE ÎN PRODUCEREA DE PROTEINE PRIN TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT CU AJUTORUL BACTERIEI E.COLI 75
    4.1 PROTOCOL PENTRU MINIPREP PLASMIDIAL (ADAPTAT DUPĂ AUSUBEL ET AL. ŞI SAMBROOK ET AL.) 75

4.2 PROTOCOL PENTRU MEDPREP PLASMIDIAL(ADAPTAT DUPĂ AUSUBEL ET AL.. ȘI SAMBROOK ET AL.) 76
4.3 PROTOCOL PENTRU ELECTROFOREZĂ ANALITICĂ A ADN ÎN GEL DE AGAROZĂ(ADAPTAT DUPĂ AUSUBEL ET AL.. ȘI SAMBROOK ET AL.) 78
4.4 PROTOCOL PENTRU ELECTROFOREZĂ PREPARATIVĂ ÎN GEL DE AGAROZĂ, ÎN SCOPUL IZOLĂRII ȘI PURIFICĂRII ADN(ADAPTAT DUPĂ AUSUBEL ET AL.. ȘI SAMBROOK ET AL.) 79

CAPITOLUL III. IZOLAREA ȘI PURIFICAREA ADN 81
(Luis POPA, Gabriela BORDEIANU, Dan CIMPONERIU, Florina RAICU, Pompilia APOSTOL)
1. INTRODUCERE 81
2. LIZA CELULARĂ 82
3. DEPROTEINIZAREA 82
4. EXTRACȚIA ADN 83
5. PRECIPITAREA ADN 83
6. MATERIALUL BIOLOGIC 85
  6.1. SÂNGE TOTAL 85
  6.2. CELULE ÎN CULTURĂ 85
  6.3. ȚESUTURI 85
7. OBȚINEREA ARN TOTAL 85
8. OBȚINEREA ARN POLI A* 86
9. DOZAREA ADN 87

CAPITOLUL IV. ELECTROFOREZA ACIZILOR NUCLEICI ȘI A PROTEINELOR . . .89
(Ionela MOANȚĂ)
1. INTRODUCERE 89
2. GELURILE 89
3. SISTEME TAMPON CONTINUE ȘI DISCONTINUE 91
4. CONDIȚII DE DISOCIERE ȘI DE NON-DISOCIERE 92
5. PREPARAREA PROBELOR 92
6. DETECTAREA PROTEINELOR ȘI A ACIZILOR NUCLEICI ÎN GELURI 93
7. ELECTROFOREZA ÎN MINIGELURI DE AGAROZĂ 94
8. ELECTROFOREZA ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ CU SDS – SODIUM DODECYL SULPHATE POLYACRILAMIDE GEL ELECTROPHORESIS (SDS-PAGE) 95
9. CONCENTRAREA IZOELECTRICĂ A PROTEINELOR (ISOELECTRIC FOCUSING) 95
10. ELECTROFOREZA BIDIMENSIONALĂ 97
11. ELECTROFOREZA ÎN GEL DE AGAROZĂ ALCALINĂ .97
12. ELECTROFOREZA ÎN CÂMP ELECTRIC PULSATORIU — PULSE FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE) 98
13. ELECTROFOREZA ÎN CÂMPURI TRANSVERSALE ALTERNATIVE — TRANSVERSE ALTERNATING FIELDS ELECTROPHORESIS (TAFE) 99
14. ELECTROFOREZA ÎN CÂMP INVERSAT — FIELD INVERSION GEL ELECTROPHORESIS (FIGE) 100
15. ELECTROFOREZA ÎN GELURI ROTATIVE 100
16. METODA CHEF (CONTOUR-CLAMPED HOMOGENOUS ELECTRIC FIELD) 100

CAPITOLUL V. PRINCIPII DE CARTARE GENICĂ 103
(Rodica TALMACI, Letiția-Corina DAN)
1. INTRODUCERE 103
2. HARTA FIZICĂ 104
3 METODE DE CARTARE GENICĂ 104
4. METODE GENETICE DE CARTARE 105
  4.1. UTILIZAREA POLIMORFISMULUI DE LUNGIME AL FRAGMENTELOR DE RESTRICȚIE (RFLP) 105
  4.2. UTILIZAREA METODEI MICROSATELIȚILOR 107
  4.3. METODE CITOLOGICE DE CARTARE 109
    4.3.1. METODA HIBRIDĂRII CELULELOR SOMATICE 109
    4.3.2. HIBRIDIZAREA MOLECULARĂ SOUTHERN, NORTHERN ȘI WESTERN BLOTTING 110
    4.3.3. PREPARAREA PROBEI 115
  4.4. HIBRIDIZAREA 116
  4.5. SPĂLAREA 117
  4.6. DETECTAREA HIBRIZILOR PROBĂ-ȚINTĂ 117
  4.7. AUTORADIOGRAFIA 117
5. HIBRIDIZAREA IN SITU PRIN FLUORESCENȚĂ (FISH) 118
6. UTILIZAREA CROMOZOMILOR ARTIFICIALI – YAC (YEAST ARTIFICIAL CHROMOSOMES) 121
7. METODA ELECTROFOREZEI PE GEL ÎN CÂMP PULSATOR (PFGE) 122
8. ULTIMA ETAPĂ A CARTĂRII: SECVENȚIEREA NUCLEOTIDICĂ 123

CAPITOLUL VI. DISECȚIA MOLECULARĂ A ACIZILOR NUCLEICI 127
(Lucian GAVRILĂ, Claudia HASSELMANN)
1. STRUCTURA ȘI FUNCȚIA NUCLEOTIDELOR 127
2. GEOMETRIA ADN-ULUI 128
3. FLEXIBILITATEA ADN 132
4. SUPERHELICAREA ADN 135
5. TOPOIZOMERAZELE CONTROLEAZĂ SUPRASPIRALIZAREA ADN 138
6. LEGĂTURILE DE HIDROGEN ȘI LEGĂTURI HOOGSTEEN 139
7. FORȚE DE STIVUIRE ȘI INTERACȚII HIDROFOBE 141
8. INTERACȚIILE IONICE 141
9. TRIPLUL HELIX 142
10. STRUCTURI CUATERNARE DE ADN 143

CAPITOLUL VII. CONFORMAȚII ADN 151
(Margareta DUMITRESCU, Rodica ION, Ionela MOANȚĂ, Pompilia APOSTOL, Dan CIMPONERIU)
1. CONFORMAȚII MAI PUȚIN OBIȘNUITE ALE ADN 151
  1.1. ADN Z 151
  1.2. CONFORMAȚIA ADN-Z IN VIVO. 153
  1.3. ADN E 156
2. MODIFICĂRI CONFORMAȚIONALE PRODUSE ÎN URMA METILĂRII SAU BROMURĂRII CITOZINEI 157

3. INCIDENȚA NATURALĂ A ADN MONOCATENAR 157
4. ADN TRIPLEX 158
5. MODELE DE ASOCIERE A CATENELOR DE ADN ÎN TRIPLEXURI 159
6. ADN CU PATRU SAU CINCI CATENE 159
7. STIVUIREA G-G, CU CATENE ÎNCRUCIȘATE 161
8. ADN-PLIAT (BEND DNA) 161
9. STRUCTURI CRUCIFORME ÎN ADN DE LA E. COLI 162
10. SUPRASTRUCTURI 162
11. ADN DIN NUCLEOPROTEINE 163
12. PUNȚILE DE HIDROGEN DINTRE BAZELE AZOTATE 163
13. ENZIME IMPLICATE ÎN SCHIMBAREA CONFORMAȚIEI ADN 164
14. TOPOIZOMERAZA I 166
15. MECANISMUL DE ACTIUNE AL TOPOIZOMERAZEI I 167
16. TOPOIZOMERAZA II 167
17. MECANISMUL DE ACȚIUNE AL TOPOIZOMERAZEI II 168
18. ADN GIRAZA 169
19. HELICAZELE 170
20. MODIFICĂRI CONFORMAȚIONALE ALE ADN ÎN TIMPUL TRANSCRIPȚIEI 170
21. POLIMORFISMUL CONFORMATIONAL AL ADN MONOCATENAR (SSCP – SINGLE STRAND CONFORMATIONAL POLYMORPHISM) 172
22. OBȚINEREA UNOR INFORMAȚII ASUPRA CONFORMAȚIILOR ADN CU AJUTORUL UNOR ENZIME ȘI AL UNOR COMPUȘI HETEROCICLICI 172
23. DETECTAREA ENZIMATICĂ A STRUCTURILOR NON B ALE ADN PRIN EVIDENȚIEREA SITUSURILOR SENSIBILE LA ACȚIUNEA NUCLEAZEI P1 ȘI PRIN REALIZAREA ELECTROFOREZEI ÎN GEL 173
24. STUDIUL CONFORMAȚIILOR ADN CU AJUTORUL UNOR COMPUȘI METALICI HETEROCICLICI 174
25. INTERACȚIA ADN CU COMPLECȘII METALICI AI TRIS FENANTROLINEI 176
26. INTERACȚIUNEA ADN CU PORFIRINELE 177
27. INTERACȚIUNEA ADN CU ALBASTRU DE METILEN 178
28. CONSIDERENTE ASUPRA INTERACȚIUNII FOSEI MICI A ADN CU DIFERITE DROGURI 179

CAPITOLUL VIII. PROTEINE CU DOMENII DE LEGARE SPECIFICE LA ADN 181
(Dan CIMPONERIU)
1. INTRODUCERE 181
2 SUPERCLASA FACTORILOR TRANSCRIPȚIONALI CARE CONȚIN MOTIVE CU ZINC 188
2.1. CLASA C2H2 189
2.2 CLASA C4 192
2.2.1 SUPERFAMILIA RECEPTORILOR NUCLEARI ZN FINGER C4 192
2.2.2. FACTORII TRANSCRIPȚIONALI GATA 195
2.3. CLASA C6 196

CAPITOLUL IX. GENOMUL SISTEMELOR MACROMOLECULARE ACELULARE:VIRUSURI, VIROIZI, VIRUSOIZI, PRIONI 217
(Alexandru ECOVOIU, Dan CIMPONERIU, Lucian GAVRILĂ)
1. INTRODUCERE 217
2. DIMENSIUNEA VIRUSURILOR 217
3. STRUCTURA VIRUSURILOR 218
    3.1. CAPSIDA VIRALĂ 218
    3.2. ANVELOPA VIRALĂ. 218
    3.3. GENOMUL VIRAL 222
4. PARTICULARITĂȚI ALE GENOMULUI VIRUSURILOR ADN 224
5. VIRUSURI CU GENOM ARN 226
6. SPECIFICITATEA VIRUSURILOR PENTRU GAZDĂ 229
7. PARAZITISMUL VIRAL 229
8. CLASIFICAREA VIRUSURILOR 231
9. CLASIFICAREA BACTERIOFAGILOR 231
10. CLASIFICAREA VIRUSURILOR FUNGALE 233
11. CLASIFICAREA VIRUSURILOR ALGALE 233
12. CLASIFICAREA VIRUSURILOR PLANTELOR 233
13. VIRUSURILE INSECTELOR 234
14. CLASIFICAREA VIRUSURILOR ANIMALE 234
    14.1. VIRUSURI CU ADN DUBLU CATENAR 235
    14.2. VIRUSURI CU ADN MONOCATENAR 236
    14.3. VIRUSURI CU ARN DUBLU CATENAR 236
    14.4. VIRUSURI CU ARN MONOCATENAR PLUS 236
    14.5. VIRUSURI CU ARN MONOCATENAR MINUS 237
    14.6. VIRUSURI CU ARN MONOCATENAR CU CATENĂ SENS (“+“) 237
15. REPLICAREA VIRUSURILOR 238
    15.1. REPLICAREA BACTERIOFAGILOR ADN 239
        15.1.1. FAGII LITICI 239
        15.1.2. FAGII LIZOGENI 239
    15.3. CICLURI DE REPLICARE MAI PUȚIN OBIȘNUITE 242
16. REPLICAREA VIRUSURILOR ADN LA ANIMALE 242
17. REPLICAREA ARN VIRAL 243
    17.1. REPLICAREA ARN FAGIC 247
    17.2. REPLICAREA VIRUSURILOR ARN LA ANIMALE. 247
    17.3. REPLICAREA VIRUSURILOR ÎN CELULA VEGETALĂ 249
18. VIRUSURILE ȘI TRANSFORMAREA MALIGNĂ 253
19. VIRUSURILE ANIMALE ȘI CANCERUL 253
20. VIRUSURILE HEPATITEI B 255
21. SIMIAN VIRUS 40 (SV40) ȘI VIRUSUL POLIOMA 255
22. VIRUSURILE PAPILOMA 256
23. ADENOVIRUSURILE 257
24. HERPESVIRUSURILE 258
25. VIRUSURILE POX 258
26. RETROVIRUSURILE 259
27. VIRUSUL IMUNODEFICIENȚEI UMANE 259
28. VIROIZI, VIRUSOIZI, PRIONI 262
.... 266

28.1. VIROIZII 266
28.2. VIRUSOIZI 267
28.3. PRIONI 268

CAPITOLUL X. GENOMUL BACTERIAN 271
(Maria DAMIAN, Maria STRĂUȚ, Lucian GAVRILĂ, Laura-Monica GEORGESCU)
1. ORGANIZAREA GENOMULUI BACTERIAN 271
  1.1 DIMENSIUNILE ȘI GEOMETRIA CROMOZOMULUI BACTERIAN 272
  1.2. ARHITECTURA CROMOZOMULUI BACTERIAN (NUCLEOIDUL BACTERIAN). 278
    1.2.1 DOMENIILE DE BUCLARE 280
    1.2.2 ROLUL ELEMENTELOR GENETICE REPETITIVE 280
  1.3. OPERONII BACTERIENI 282
    1.3.1. OPERONUL LAC AL BACTERIEI ESCHERICHIA COLI 284
    1.3.2. OPERONUL TRP 286
    1.3.3. OPERONUL PENTRU ARNR 286
    1.3.4. OPERONII ARNT 290
  1.4. REPLICAREA CROMOZOMULUI BACTERIAN 292
    1.4.1 REGLAREA INIȚIERII REPLICĂRII CROMOZOMULUI BACTERIAN PRIN INTERMEDIUL PROTEINELOR DNAA. 294
    1.4.2. COORDONAREA REPLICĂRII CROMOZOMULUI BACTERIAN CU DIVIZIUNEA CELULARĂ. 295
    1.4.3. ROLUL MEMBRANEI CELULARE BACTERIENE ȘI AL MEZOSOMULUI ÎN PROCESUL DE REPLICARE 297
  1.5. DINAMICA GENOMULUI BACTERIAN 299
    1.5.1. REARANJAMENTELE CROMOZOMALE 299
  1.6. CROMOZOMI LINEARI 301
    1.6.1. ORIGINEA ADN LINEAR 301
2. EREDITATEA EXTRACROMOZOMALĂ BACTERIANĂ – PLASMIDE BACTERIENE 302
  2.1. STRUCTURA PLASMIDELOR BACTERIENE 303
  2.2. FUNCȚII CODIFICATE DE PLASMIDE 303
  2.3. PROPRIETĂȚI GENERALE ALE PLASMIDELOR 305
    2.3.1. REPLICAREA PLASMIDELOR 305
    2.3.2. SPECTRUL DE GAZDĂ 308
    2.3.3. NUMĂRUL DE CÓPII PLASMIDICE PER CELULĂ 309
    2.3.4. CONTROLUL REPLICĂRII PLASMIDELOR PRIN SECVENȚE REPETATE DE ADN (ITERONI) 309
    2.3.5. MECANISME DE ÎMPIEDICARE A PIERDERII PLASMIDELOR 310
    2.3.6. FENOMENUL DE INCOMPATIBILITATE 311
  2.4. DETECTAREA ȘI IZOLAREA PLASMIDELOR 312
  2.5. TRANSFERUL DE MATERIAL GENETIC LA BACTERII 312
  2.6. VECTORI DE CLONARE ȘI DE EXPRESIE PLASMIDICI 317
    2.6.1. VECTORUL DE CLONARE PBR322 317
    2.6.2.VECTORI DE EXPRESIE 318
    2.6.3. VECTORI NAVETĂ (SHUTTLE VECTORS) 319
3. ELEMENTE GENETICE TRANSPOZABILE LA BACTERII 319

3.1. PRINCIPALELE TIPURI DE TRANSPOZONI BACTERIENI 319
3.1.1. SECVENȚELE DE INSERIE 319
3.1.2. TRANSPOZONII COMPUȘI 321
3.1.3. TRANSPOZONII COMPLECȘI 321
3.1.4. BACTERIOFAGII MU ȘI D108 322
3.2. MODELE MOLECULARE PENTRU TRANSPOZIȚIE 323
3.2.1. TRANSPOZIȚIE REPLICATIVĂ 323
3.2.2. TRANSPOZIȚIE CONSERVATIVĂ 324
3.3. DOVEZI EXPERIMENTALE ALE TRANSPOZIȚIEI 324
3.3.1. TESTUL DE VALIDARE A TRANSPOZIȚIEI PRIN CONJUGARE (MATING-OUT ASSAY) 324
3.3.2. TESTAREA TRANSPOZIȚIEI CU UN VECTOR SINUCIGAȘ 326
3.4. TRANSPOZONI CONJUGATIVI 327
4. UTILIZAREA TEHNICILOR DE ANALIZĂ MOLECULARĂ A GENOMULUI BACTERIAN ÎN DIAGNOSTIC ȘI EPIDEMIOLOGIE 329
4.1. DESCRIERE DE GENOTIPURI ÎN SCOP TAXONOMIC 330
4.2. ANALIZA MOLECULARĂ A ADN TOTAL ÎN SCOP EPIDEMIOLOGIC ... 330
4.2.1. ANALIZA DE RESTRICȚIE A GENOMULUI BACTERIAN 330
4.2.2. VARIABILITATEA TULPINILOR BACTERIENE LA NIVEL DE SPECIE. .. 331
4.2.3. DETERMINAREA STRUCTURII CLONALE A POPULAȚIILOR BACTERIENE 333
4.3. DIAGNOSTICUL MOLECULAR AL INFECȚIILOR BACTERIENE 335
4.4. PROFILUL PLASMIDIC, PLASMIDE EPIDEMICE ȘI/SAU PLASMIDE CU REZISTENȚĂ LA MULTIPLE ANTIBIOTICE 336

CAPITOLUL XI. GENOMUL CIANOBACTERIAN 339
(Lucian GAVRILĂ, Lorelai-Bianca GAVRILĂ, Valeria-Rosalinda GAVRILĂ)
1. GENERALITĂȚI 339
2. ASPECTE ALE CITODIFERENȚIERII LA CIANOBACTERII 351
3. GENOMUL CIANOBACTERIAN 358

CAPITOLUL XII. MUTAGENEZA LA CIANOBACTERII 379
(Lorelai-Bianca GAVRILĂ, Valeria-Rosalinda GAVRILĂ)

CAPITOLUL XIII. PLASMIDE CIANOBACTERIENE 389
(Valeria-Rosalinda GAVRILĂ, Lorelai-Bianca GAVRILĂ, Alexandru VLADIMIRESCU)

CAPITOLUL XIV. REPARAREA LEZIUNILOR INDUSE ÎN ADN ȘI FENOMENELE DE PROTECȚIE 397
(Valeria-Rosalinda GAVRILĂ, Lorelai-Bianca GAVRILĂ)
1. FOTOREACTIVAREA 397
2. REPARAREA LA ÎNTUNERIC 398

CAPITOLUL XV. TRANSFER DE GENE LA CIANOBACTERII PRIN TRANSFORMARE, CONJUGARE ȘI TRANSDUCȚIE 401
(Lucian GAVRILĂ, Alexandru VLADIMIRESCU, Lorelai-Bianca GAVRILĂ, Valeria-Rosalinda GAVRILĂ)

CAPITOLUL XVI. GENE, PRODUȘI GENICI ȘI CARTARE GENICĂ LA CIANOBACTERII .405
(Lucian GAVRILĂ, Valeria-Rosalinda GAVRILĂ, Lorelai-Bianca GAVRILĂ)
1. INTRODUCERE .405
2. GENELE PENTRU FICOBILIPROTEINE .409
3. GENELE PENTRU SISTEMUL FOTOSINTETIC .410
4. REARANJAMENTUL GENELOR FIXATOARE DE AZOT, ÎN CURSUL DIFERENȚIERII HETEROCISTULUI .410

CAPITOLUL XVII. TOXINELE CIANOBACTERIILOR .415
(Alexandru VLADIMIRESCU, Lucian GAVRILĂ)

CAPITOLUL XVIII. CERCETĂRI ROMÂNEȘTI ASUPRA GENETICII CIANOBACTERIILOR .419
(Lucian GAVRILĂ, Lorelai-Bianca GAVRILĂ, Valeria-Rosalinda GAVRILĂ, Horia MANIU, Alexandru VLADIMIRESCU)

CAPITOLUL XIX. DATE RECENTE ASUPRA ORGANIZĂRII GENOMULUI CIANOBACTERIAN .433
(Lucian GAVRILĂ, Alexandru VLADIMIRESCU, Lorelai-Bianca GAVRILĂ, Valeria-Rosalinda GAVRILĂ)

CAPITOLUL XX. ORGANIZAREA GENOMICĂ MEZOCARIOTĂ .455
1. INTRODUCERE .455
2. CROMOZOMII DINOFLAGELATELOR .455
3. ORGANIZAREA NUCLEARĂ .459
4. ADN CROMOZOMAL .465
5. MODELE DE ARHITECTURĂ CROMOZOMALĂ LA DINOFLAGELATE .469
6. ACTIVITATEA NUCLEOLARĂ LA DINOFLAGELATE .475

CAPITOLUL XXI. ORGANIZAREA GENOMULUI EUCARIOT .481
(Lucian GAVRILĂ)
1. INTRODUCERE .481
2. STRUCTURA CROMOZOMILOR .482
  2.1. ADN CROMOZOMAL .482
    2.1.1. SECVENȚE DE ADN ÎNALT REPETITIVE .483
    2.1.2. PALINDROAMELE .485
    2.1.3. SECVENȚE DE ADN MEDIU REPETATE .486
    2.1.4. ELEMENTELE GENETICE MOBILE (TRANSPOZABILE) .487
    2.1.5. SECVENȚELE UNICE DIN ADN EUCARIOT .489
  2.2. PROTEINELE CROMOZOMALE .489
    2.2.1. HISTONELE .489
    2.2.2. PROTEINELE NON-HISTONICE .490
  2.3. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC ÎN CROMOZOMII METAFAZICI .491
    2.3.1. GENERALITĂȚI .491

2.3.2. FIBRA NUCLEOZOMALĂ 492
2.4. DOMENIILE CROMATINICE 501
2.5. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC ÎN CROMOZOMII INTERFAZICI 504
3. ORGANIZAREA SUPRACROMOZOMALĂ A GENOMULUI EUCARIOT 506

CAPITOLUL XXII. ORGANIZAREA GENOMICĂ LA EUGLENOPHYCEAE 511
(Lucian GAVRILĂ)
1. INTRODUCERE 511
2. DIVIZIUNEA EUGLENOIDĂ — HAPLOMITOZA 512
3. STRUCTURA FINĂ A CROMATINEI EUGLENOFICEELOR 518
4. CLOROPLASTELE EUGLENOFICEELOR ȘI PARASEXUALITATEA 524
5. VARIAȚIA NUMĂRULUI DE CROMOZOMI 524

CAPITOLUL XXIII. GENOMUL DROJDIILOR 527
(Ramona CERNAT)
1. INTRODUCERE 527
2. GENOMUL NUCLEAR DE S.CEREVISIAE 528
3. CARACTERIZAREA TRANSCRIPTOMULUI DE LA S.CEREVISIAE 530
4. CARACTERIZAREA PROTEOMULUI DE DROJDIE 531
5. EVOLUȚIA GENOMULUI DE LA S.CEREVISIAE 531
6. ORGANIZAREA STRUCTURALĂ A CROMOZOMULUI DE S.CEREVISIAE 534
7. ELEMENTE STRUCTURALE NUCLEOSOMALE 536
7.1. HISTONELE - ELEMENTELE MIEZULUI NUCLEOSOMAL 536
7.2. HISTONELE LINKER 536
7.3. COMPONENTELE NON-HISTONICE ALE CROMATINEI 538
7.4. FACTORI ACCESORII 539
7.5. DEACETILAZE HISTONICE (HDAC – HISTONE DEACETYLASES) 540
7.6. ACETILAZE HISTONICE (HAT – HISTONE ACETYLTRANSFERASE) 541
8. ASAMBLAREA CROMATINEI 543
9. CROMATINA SILENȚIATĂ LA DROJDII 545
10. PROTEINELE SIR - MEDIATORI AI SILENȚIERII TRANSCRIPȚIONALE 548
11. ORGANIZAREA FUNCȚIONALĂ A CROMOZOMULUI DE LA S.CEREVISIAE 550
12. CENTROMERII (CEN) 550
12.1. DEFINIREA GRANIȚELOR UNUI CEN EUCARIOT 550
12.2. PROTEINE CENTROMERICE 552
12.3. PROTEINE STRUCTURALE CENTROMERICE 554
13. TELOMERE (TEL) 558
14. RECRUTAREA TELOMERAZEI 559
15. REGLAREA LUNGIMII TEL 561
16. EFECTUL DE POZIȚIE A TELOMEREI - TPE (TELOMERE POSITION EFFECT) 563
17. ELEMENTE GENETICE MOBILE LA S.CEREVISIAE 564
18. YAC-URI (YEAST ARTIFICIAL CHROMOSOMES) – CROMOZOMI ARTIFICIALI DE DROJDII 568

19. UTILIZAREA YAC-URILOR ÎN TRANSFERUL DE GENE 574
19.1. LIPOFECȚIA 574
19.2. FUZIUNEA DE SFEROPLAȘTI 575
19.3. MICROINJECȚIA DIRECTĂ 576
19.4. APLICAȚII ALE TRANSGENEZEI YAC-URILOR LA ȘOARECI 576
19.5. ANALIZA GENOMURILOR MAMALIENE .577
19.6. MODELE DE MALADII UMANE 579
20. CICLUL DE VIAȚĂ ȘI DIVIZIUNEA CELULARĂ LA S.CEREVISIAE 580
21. MITOZA LA S.CEREVISIAE 591
22. MOTOARE MITOTICE LA S.CEREVISIAE 592
23. STABILIREA COEZIUNII CROMATIDELOR-SURORI ÎN CURSUL MITOZEI LA S.CEREVISIAE 598
24. COEZIUNEA CROMATIDELOR ÎN MEIOZĂ 602
25. STRUCTURA ELEMENTELOR GENETICE ȘI MECANISMUL INTERCONVERSIEI TIPULUI DE ÎMPERECHERE LA DROJDII 604
26. REGLAJUL GENETIC AL INTERCONVERSIEI TIPULUI DE ÎMPERECHERE (REGLAJUL EXPRESIEI GENELOR SPECIFICE TIPULUI DE ÎMPERECHERE) 608
27. REPRESIA GENICĂ REALIZATĂ DE CĂTRE COMPLEXELE PROTEICE A2-MCM1 ȘI A2-A1 609
28. ACTIVAREA GENICĂ DE CĂTRE COMPLEXUL A1-MCM1 611
29. ACTIVAREA GENICĂ PRIN PROTEINA MCM1 ȘI PROTEINA STE12 ACTIVATĂ DE CĂTRE FEROMONI (FIG. 42.) 611
30. SPECIFICITATEA CELULELOR HAPLOIDE .613
31. SPECIFICITATEA CICLULUI CELULAR 613
32. SEMNALIZAREA PRIN FEROMONI LA S.CEREVISIAE 614
33. RECEPTORII ȘI PROTEINA G 614
34. TRANSDUCȚIA SEMNALELOR LA S.CEREVISIAE 616
35. REPLICAREA ADN LA S.CEREVISIAE 618
35.1. PUNCTUL DE CONTROL S/M AL REPLICĂRII LA S.POMBE. 618
35.2. PUNCTUL DE CONTROL S/M AL REPLICĂRII LA S.CEREVISIAE. 619
35.3. COMPARAȚIE CU EUCARIOTELE SUPERIOARE 620
36. STRUCTURA REPLICATORILOR DE LA S.CEREVISIAE 621
37. ADN POLIMERAZE LA S.CEREVISIAE 622
38. MECANISMUL INIȚIERII REPLICĂRII LA S.CEREVISIAE 625
39. MECANISMELE ACTIVĂRII TRANSCRIPȚIONALE 631
39.1. PREINIȚIEREA ȘI INIȚIEREA TRANSCRIERII 631
39.2. REMODELAREA CROMATINEI 632
39.3. CROMOZOMUL ȘI REGLAREA TRANSCRIERII LA S.CEREVISIAE 632
39.4. CROMATINA ȘI TRANSCRIEREA: REGLATORI POZITIVI ȘI NEGATIVI 634
40. ELEMENTE STRUCTURALE NEGATIVE 635
40.1. HISTONELE: ELEMENTELE MIEZULUI NUCLEOSOMAL 635
40.2. FACTORI REGLATORI POZITIVI –COMPLEXUL SWI/SNF DE REMODELARE A NUCLEOSOMILOR 638
40.3. COMPLEXUL SAGA 640
40.4. INTERACȚII GENETICE ÎNTRE DIFERITELE COMPLEXE 641

40.5. MODELUL INTERACȚIEI GENETICE A COMPLEXELOR 642
40.6. RECRUTAREA ȘI ASAMBLAREA COMPLEXULUI DE TRANSCRIERE ...642
40.7. PROTEINE TBP DE LEGARE LA CUTIA TATA (TBP –TATA-BINDING PROTEINS) 644
40.8. FACTORI DE TRANSCRIERE TF (TF-TRANSCRIPTION FACTOR) 644
40.9. FACTORI TRANSCRIPȚIONALI CE INTERACȚIONEAZĂ DIRECT CU HISTONELE 646
40.10. FACTORI TAF ȘI MEDIATORUL SRB DE LA S.CEREVISIAE 647
41. ARN POLIMERAZE LA S.CEREVISIAE 652
42. ELONGAREA LANȚULUI ARNM 657
43. MECANISMUL DE DEPLASARE A ARN (RNA DISPLACEMENT) 659
44. TERMINALIZAREA TRANSCRIERII 660
45. PROCESAREA ARNM PREMATUR 661
45.1. BONETAREA (CAPPING) CAPĂTULUI 5' AL ARN PREMATUR 661
45.2. POLIADENILAREA CAPĂTULUI 3' AL ARNM PREMATUR 662
46. SPLICING-UL ARN PREMATUR 664
47. STABILITATEA ARNM LA S.CEREVISIAE 672
48. TURNOVER-UL ARNM ȘI TRANSLAȚIA 673
49. DEADENILAZELE ARNM 675
50. MAȘINĂRIA DE DEBONETARE 675
52. INIȚIEREA TRANSLAȚIEI 676
53. SESIZAREA ȘI RĂSPUNSUL LA ADN LEZAT 680
54. TRANSDUCȚIA SEMNALULUI ADN LEZAT 684
55. MECANISME REPARATORII ALE ADN LA S.CEREVISIAE 685
56. PUNCTUL DE CONTROL G2/M AL LEZIUNILOR ADN DE LA SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE 686
57. PUNCTELE DE CONTROL METAFAZIC ALE LEZĂRII ADN LA S.CEREVISIAE 690
58. SISTEME DE REPARARE ADN LA S.CEREVISIAE 691
59. STRUCTURA CROMATINEI ȘI REPARAREA RUPTURILOR DUBLU-CATENARE 702

CAPITOLUL XXIV. GENOMUL FUNGILOR 705
(Irina RADU, Lucian GAVRILĂ)

CAPITOLUL XXV. GENOMUL EUCARIOTELOR FOTOSINTETIZANTE INFERIOARE 717
(Lucian GAVRILĂ, Alexandru VLADIMIRESCU)
1. ALGELE VERZI (CHLOROPHYTA) 717
2. ADN LA CONJUGATA 722
3. ADN LA CHRYSOPHYTA 722
4. ADN LA PHAEOPHYTA 723
5. ADNMT DIN FEOFITA PYLAIELLA LITTORALIS 723
6. ADN- LA RHODOPHYTA 723

CAPITOLUL XXVI. CLUSTERI DE GENE ÎN GENOMUL ALGELOR 725
(Alexandru VLADIMIRESCU, Lucian GAVRILĂ)
1. CLUSTERI DE GENE NUCLEARE 725
  1.1 LOCUSUL DE ÎMPERECHERE (MT: MATING TYPE LOCUS) LA CH.REINHARDTII 725
  1.2 GRUPUL NUCLEAR DE LINKAGE „UNI", LA CH. REINHARDTII 726
2. CLUSTERUL PLASTIDIAL DE GENE ERY-1 DE LA CH.REINHARDTII 726
3. CLUSTERI DE GENE PLASTIDIALE 727
  3.1. ZONE IR 727

CAPITOLUL XXVII. ARHITECTURA GENELOR LA ALGEȘI CITOGENETICA GRUPELOR SUPERIOAREDE ALGE 731
(Alexandru VLADIMIRESCU, Lucian GAVRILĂ)
1. PARTICULARITĂȚI ALE GENELOR NUCLEARE LA CHLAMYDOMONAS REINHARDTII 731
2. CARACTERISTICI ALE GENELOR DIN GENOMUL PLASTIDIAL LA CH.REINHARDTII 732
3. CARACTERISTICI ALE GENELOR MITOCONDRIALE LA CH.REINHARDTII . .732
4. ARHITECTURA GENEI NUCLEARE ARG7, DE LA CHLAMYDOMONAS 733
5. ARHITECTURA GENEI PLASTIDIALE PSBA 735
6. GENELE NUCLEARE PENTRU ARNR 18S, 5.8S, 28S LA ALGE 737
7. GENELE PLASTIDIALE PENTRU ARNR :16S, 23S, 5S 740
8. ELEMENTE REPETITIVE CARACTERISTICE UNEI SPECII/TULPINI DE ALGE VERZI 743
9. EVOLUȚIA NUCLEOLULUI LA ALGE CONJUGATE 744
10. CHAROPHYTA 747

CAPITOLUL XXVIII. GENOMUL ALGELOR CRIZOFITE (CHRYSOPHYTA) 751
(Alexandru VLADIMIRESCU, Lucian GAVRILĂ)
1. XANTOFICEELE (XANTHOPHYCEAE) 751
2. CRIZOFICEE (CHRYSOPHYCEAE) 753
3. DIATOMEE (BACILLARIOPHYCEAE) 754

CAPITOLUL XXIX. GENOMUL ALGELOR BRUNE (PHAEOPHYTA) 759
(Alexandru VLADIMIRESCU)

CAPITOLUL XXX. GENOMUL ALGELOR ROȘII (RHODOPHYTA) 761
(Alexandru VLADIMIRESCU)

CAPITOLUL XXXI. STUDII RECENTE ASUPRA ADN ȘI APARATULUI GENETIC LA UNELE GRUPE MAJORE DE ALGE 765
(Alexandru VLADIMIRESCU, Lucian GAVRILĂ)
1. ADN LA CLOROFITE 765
2. ADN LA VOLVOCALES 767
3. ADN LA PROTOCOCCALES 767
4. ADN- LA SIPHONALES /SIPHONOCLADALES 768

5. ORDINUL VOLVOCALES .768
6. ASPECTE GENETICE ÎN ORDINUL CHLOROCOCCALES .770
7. ORDINUL ULOTRICHALES .772
8. ORDINUL OEDOGONIALES .774
9. ORDINUL SIPHONALES / SIPHONOCLADALES .776
10. ORDINUL CLADOPHORALES .777
11. ORDINUL CONJUGATA .777

CAPITOLUL XXXII. GENOMUL NUCLEAR AL LICHENILOR, MUȘCHILOR ȘI FERIGILOR .779
(Irina RADU)
1. LICHENII .779
2. FERIGILE .781
3. BRIOFITELE .787

CAPITOLUL XXXIII. GENOMUL NUCLEAR AL PLANTELOR SUPERIOARE .793
(Irina RADU, Lucian GAVRILĂ)
1. INTRODUCERE .793
2. GENOMUL OREZULUI .797
3. GENOMICA COMPARATIVĂ A GRÂNELOR .802
4. UTILIZAREA EFECTULUI STATMOKINETIC AL COLCHICINEI LA PORUMB .809
5. EVOLUȚIA CARIOTIPULUI PLANTELOR SUPERIOARE .814

CAPITOLUL XXXIV. ORGANIZAREA STRUCTURAL-FUNCȚIONALĂ A GENOMULUI LA DROSOPHILA MELANOGASTER .821
(Alexandru ECOVOIU)
1. INTRODUCERE .821
  1.1 IMPORTANȚA ORGANISMULUI MODEL D. MELANOGASTER ÎN DEZVOLTAREA GENETICII .821
2. ORGANIZAREA GENOMULUI LA D. MELANOGASTER .824
  2.1 CROMOZOMII POLITENI ȘI HĂRȚILE CROMOZOMALE .826
  2.2 TIPURI DE SECVENȚE DIN GENOMUL D. MELANOGASTER .830
  2.3 ASPECTE ALE FENOMENULUI DE PLEIOTROPIE LA D. MELANOGASTER .830
  2.4 REZULTATE ALE SECVENȚIERII PORȚIUNII EUCROMATICE A GENOMULUI D. MELANOGASTER .832
3. TIPURI DE TRANSPOZONI ÎNTÂLNIȚI ÎN GENOMUL GENULUI DROSOPHILA .834
  3.1 ELEMENTUL P .834
  3.2 ELEMENTUL HOBO .837
  3.3 ELEMENTUL MARINER .837
  3.4 ELEMENTUL MINOS .838
  3.5 RETROTRANSPOZONI DIN GENOMUL SPECIEI D. MELANOGASTER .838
    3.5.1 RETROTRANSPOZONUL GYPSY .838
    3.5.2 ELEMENTUL I .839

3.5.3 ELEMENTELE COPIA-LIKE .... .839
3.5.4 RETROTRANSPOZONII HET-A ȘI TART .... .839
4. PARTICULARITĂȚI FUNCȚIONALE ALE GENOMULUI LA D. MELANOGASTER CU IMPACT ASUPRA PROCESULUI DE DEZVOLTARE .... .841
4.1 MECANISME SPECIALE DE REGLAJ GENETIC .... .841
4.2 ELEMENTE DE GENETICA DEZVOLTĂRII LA D. MELANOGASTER .... .844
4.2.1 GENE CU EFECT MATERN (MATERNAL-EFFECT GENES) .... .844
4.2.2. GENE ZIGOTICE .... .847
4.2.3.GENE ZIGOTICE GAP (GAP GENES) .... .848
4.2.4. GENE ZIGOTICE PAIR-RULE .... .848
4.2.5. GENE ZIGOTICE ALE POLARITĂȚII SEGMENTELOR (SEGMENT-POLARITY GENES) .... .849
4.3. GENE HOMEOTICE SELECTOARE .... .849
5. ASPECTE GENETICE IN DETERMINAREA SEXULUI LA D. MELANOGASTER .... .851
6. EFECTUL DE POZIȚIE LA D. MELANOGASTER .... .852
7. METODE ALE INGINERIEI GENETICE UTILIZATE ÎN ANALIZA GENOMULUI LA D. MELANOGASTER .... .853
7.1 TEHNICA ENHANCER TRAPPING .... .854
7.2 TEHNICI DE DETECTARE A MUTAGENEZEI INSERȚIONALE .... .855
7.2.1 DETECTAREA PRIN TEHNICA PCR A MUTAGENEZEI INSERȚIONALE ÎNTR-O GENĂ DE INTERES .... .855
7.2.2 TEHNICILE PLASMID RESCUE ȘI INVERSE PCR .... .856
7.3. STUDIUL EXPRESIEI ECTOPICE A GENELOR LA D. MELANOGASTER .... .857
7.3.1 EXPRIMAREA ECTOPICĂ A UNEI GENE DE INTERES SUB INFLUENȚA PROMOTORULUI UNEI ALTE GENE .... .857
7.3.2 EXPRIMAREA ECTOPICĂ A UNEI GENE DE INTERES SUB INFLUENȚA UNUI PROMOTOR INDUCTIBIL PRIN ȘOC TERMIC .... .858
7.3.3 EXPRIMAREA ECTOPICĂ A UNEI GENE DE INTERES CU AJUTORUL SISTEMULUI FLP-FRT .... .858
7.3.4 EXPRIMAREA ECTOPICĂ A UNEI GENE DE INTERES PRIN UTILIZAREA SISTEMULUI GAL4-UAS .... .859

CAPITOLUL XXXV. EVOLUȚIA CARIOTIPULUI LA VERTEBRATE .... .861
(Lucian GAVRILĂ, Liliana BURLIBAȘA)
1. INTRODUCERE .... .861
2. GENOMUL PEȘTILOR .... .866
3. GENOMUL AMFIBIENILOR .... .872
4. GENOMUL REPTILIAN .... .878
5. GENOMUL PĂSĂRILOR .... .881
6. GENOMUL MAMIFERELOR .... .886
7. VARIAȚIA CANTITĂȚII DE ADN ȘI EVOLUȚIA GENOMULUI LA VERTEBRATE .... .900
8. ROLUL MODIFICĂRILOR DE CARIOTIP ÎN SPECIAȚIA ANIMALELOR .... .908
9. POLIMORFISMUL CROMOZOMAL .... .909
10. POLIMORFISMUL STRUCTURAL .... .911

CAPITOLUL XXXVI. ORGANIZAREA GENOMICĂ LA MAMIFERE 913
(Lucian GAVRILĂ, Rodica TĂLMACI)
1. STRUCTURA GENOMULUI 913
    1.1. GENUL ELLOBIUS (CRICETIDAE) 913
    1.2. GENUL CITELLUS (SCIURIDAE) - SPECII CE SE CARACTERIZEAZĂ PRIN DIFERENȚE ÎN STRUCTURA FINĂ A CROMOZOMILOR 918
    1.3. ROZĂTOARE: HAMSTERII „PALEARCTICI" – O GRUPĂ DE SPECII CU DIFERENȚE ÎN NUMĂRUL CROMOZOMILOR ȘI ÎN CANTITATEA HETEROCROMATINEI (SUBFAMILIA CRICETINAE) 923
    1.4. .MAMIFERELE MARINE (CETACEE ȘI PINIPEDE) - GRUPE CU VITEZA MICA DE EVOLUȚIE CARIOTIPICĂ 927
    1.5. ASPECTE GENERALE PRIVIND STRUCTURA GENOMULUI LA MAMIFERE 931
2. ORGANIZAREA GENOMULUI MAMIFERELOR 937
    2.1.ORGANIZAREA GENOMULUI LA OM 937
    2.2. ORGANIZAREA GENOMULUI LA HAMSTERI 937
    2.3. ORGANIZAREA GENOMULUI LA POPÂNDĂI 940
    2.4. DIVERSITATEA POSIBILITĂȚILOR DE ORGANIZARE A GENOMULUI LA MAMIFERE 943
3. DIMENSIUNEA GENOMULUI 947

CAPITOLUL XXXVII. GENOM SUIN (PORCIN), GENOM BOVIN ȘI GENOM CANIN 959
(Lucian GAVRILĂ, Liliana BURLIBAȘA)
1. INTRODUCERE 959
2. HARTA CROMOZOMALĂ LA PORC (SUS SCROFA) 960
3. STUDII CITOGENETICE LA FAMILIA BOVIDAE 961
4. ANOMALII CROMOZOMALE: 963
5. CARIOTIPUL CÂINELUI (CANIS FAMILIARIS) 964

CAPITOLUL XXXVIII. MODELUL GENOMIC – ARABIDOPSIS THALIANA 967
(Irina RADU, Gabriela ȚENEA)

CAPITOLUL XXXIX. UNELE CARACTERISTICI MOLECULARE ALE COMPONENTELOR GENOMICE DE LA TOMATE ȘI PORUMB 981
(Nicolai BĂRBĂCARU)
1. INTRODUCERE 981

CAPITOLUL XL. MODELUL GENOMIC CAENORHABDITIS ELEGANS 993
(Pompilia APOSTOL)
1. INTRODUCERE 993
2. ORGANIZARE CROMOZOMALĂ ȘI STRUCTURĂ GENICĂ 994
3. GENE IMPLICATE ÎN DETERMINAREA SEXULUI 999
4. DETERMINAREA SOMATICĂ A SEXULUI 1002
5. DETERMINAREA LINIEI GERMINALE SEXUALE 1004
    5.1. DETERMINAREA SEXULUI HERMAFRODIT 1004

5.2. DETERMINAREA LINIEI GERMINALE MASCULINE 1006
6. GENE CARE CODIFICĂ FACTORI TRANSCRIPȚIONALI, CU ROL ÎN CONTROLUL DEZVOLTĂRII 1007
7. GENELE STAT LA C. ELEGANS 1010

CAPITOLUL XLI. ANALIZA GENOMULUI UMAN: ASPECTE FUNDAMENTALE ȘI METODOLOGII 1013
(Lucian GAVRILĂ, Rodica TĂLMACI)
1. PROGRAMUL GENOM UMAN 1013
2. PARTICULARITĂȚILE GENOMULUI UMAN 1016
3. ORIGINEA ȘI EVOLUȚIA GENOMULUI UMAN 1018
4. CARTAREA GENICĂ 1023
4.1. STRATEGII DE CARTARE 1023
4.2. NOȚIUNI DE CARTARE GENICĂ 1025
4.2.1.TIPURI DE HĂRȚI CROMOZOMALE 1025

CAPITOLUL XLII. GENOMUL UMAN ÎN PATOLOGIE 1027
(Rodica TĂLMACI, Lucian GAVRILĂ)
1. MODIFICĂRI CROMOZOMALE NUMERICE 1027
1.1. ANEUPLOIDII CROMOZOMALE HETEROZOMALE 1027
1.2. ANEUPLOIDII CROMOZOMALE AUTOZOMALE 1030
1.3. POLIPLOIDII 1031
2. MODIFICĂRI CROMOZOMALE STRUCTURALE 1032
3. ALTE MODIFICĂRI GENOMICE 1040
3.1. STRUCTURILE DOUBLE MINUTES (DM) ȘI HOMOGENEOUSLY STAINING REGIONS (HSR) 1040
3.2. SITUSURILE FRAGILE 1046
3.2.1. SINDROMUL X FRAGIL 1049
3.3. CROMOZOMUL Y SATELITAT 1052
3.4. LIPSA INCTIVĂRII X ASOCIATĂ CU IZODISOMIA X MATERNĂ. 1052

CAPITOLUL XLIII. ORGANIZAREA GENOMURILOR EXTRANUCLEARE 1057
(Lucian GAVRILĂ, Aurel ARDELEAN)
1. INTRODUCERE: PRINCIPII DE EREDITATE EXTRANUCLEARĂ 1057
2. ORIGINEA MITOCONDRIILOR ȘI CLOROPLASTELOR PRECUM ȘI A CELULEI EUCARIOTE 1060
3. GENOMUL MITOCONDRIAL 1068
3.1. ORGANIZAREA GENOMULUI MITOCONDRIAL 1068
3.2. REPLICAREA ADN MITOCONDRIAL 1076
3.3. CODIFICARE ȘI DECODIFICARE ÎN GENOMUL MITOCONDRIAL 1078
3.4. EXPRESIA GENELOR MITOCONDRIALE 1081
3.5.MUTAȚII MITOCONDRIALE ȘI EVOLUȚIA GENOMULUI MITOCONDRIAL 1081
3.6. GENOMUL MITOCONDRIAL AL PLANTELOR 1084
3.7. ADN DIN MITOCONDRIILE NEOBIȘNUITE ALE TRIPANOSOMELOR SAU ADN KINETOPLASTIC (ADNK) 1088

3.8. EDITAREA ARN 1096
3.9. STRUCTURI PLASMIDIFORME EXTRANUCLEARE 1098
3.10. GENA T-URF 13 ȘI RELAȚIA SA CU STERILITATEA MASCUL CITOPLASMATICĂ (SMC) 1101
4. GENOMUL CLOROPLASTIC 1104
4.1. INTRODUCERE 1104
4.2. BIOLOGIA CLOROPLASTELOR 1104
4.3. ANALIZA GENOMULUI CLOROPLASTIC 1108
4.4. ARANJAMENTUL STRUCTURAL – FUNCȚIONAL AL GENELOR CLOROPLASTICE ȘI REGLAREA ACTIVITĂȚII GENELOR CLOROPLASTICE 1118
4.4. TRANSCRIPȚIA ȘI TRANSLAȚIA GENETICĂ CLOROPLASTICĂ 1124
4.5. PROCESUL DE ARN-EDITING ÎN CLOROPLASTELE PLANTELOR SUPERIOARE 1126
4.6. MUTAțIILE GENOMULUI CLOROPLASTIC 1127
4.7. ASPECTE FILOGENETICE 1130

CAPITOLUL XLIV. FLUX GENIC INTERGENOMIC ÎN CELULELE EUCARIOTE 1133
(Aurel ARDELEAN, Lucian GAVRILĂ)

CAPITOLUL XLV. FINGERPRINTING GENETIC-MOLECULAR SAU AMPRENTAREA ADNPENTRU IDENTIFICAREA DE PERSOANĂ 1145
(Francisc MIXICH)
1. PRINCIPII GENERALE 1145
2. ANALIZA MINISATELIȚILOR PRIN UTILIZAREA PROBELOR "MULTI-LOCUS" ȘI "SINGLE-LOCUS" 1147
3. ANALIZA STR BAZATĂ PE PCR 1148
4. ADN MITOCONDRIAL (ADNMT) 1150
5. VARIAȚIILE CROMOZOMULUI Y 1150
6. METODOLOGIA IDENTIFICĂRII DE PERSOANĂ PRIN ANALIZA STR CU SISTEMELE MULTIPLEX PROMEGA (SUA) 1151
7. EXTRACȚIA ADN DIN PROBELE BIOLOGICE 1152
8. AMPLIFICAREA PROBELOR DE ADN (REACȚIA PCR) 1153
9. ELECTROFOREZA PRODUȘILOR PCR ÎN GEL DENATURANT DE POLIACRILAMIDĂ 1157
10. EVALUAREA STATISTICĂ A TESTELOR ADN 1159
FRECVENȚA ALELELOR PENTRU LOCII DETERMINAȚI CU „GENEPRINT® STR SYSTEM“ (PROMEGA, SUA), ÎN ROMÂNIA 1170

BIBLIOGRAFIE 1175

CAPITOLUL I

METODE DE ANALIZĂ A GENOMULUI

1. INTRODUCERE

După descifrarea structurii atomului, și mai ales după stabilirea complexității structurii nucleului, s-a considerat că fuseseră rezolvate marile probleme în domeniu. Ulterior s-a constatat, în mod surprinzător, că descoperirea unor noi particule elementare de tipul mezonilor, leptonilor etc., a pus noi întrebări legate de structurile respective și în special de „funcționarea“ lor în baza unor legi specifice unor nivele energetice subatomice și nucleare.

La un moment dat, biologii și biochimiștii implicați în studii de genetică s-au aflat într-o situație asemănătoare, după stabilirea tipului și numărului cromozomilor corespunzători diferitelor specii de organisme. Pentru scurtă vreme s-a crezut că simpla identificare a genelor ar putea constitui un punct final al descifrării structurii materiei vii. Însă existența a zeci de mii de gene care trebuie localizate și cartate a ridicat alte probleme, cu privire la compoziția și structura acizilor nucleici constitutivi. De o importanță covârșitoare s-a dovedit corelarea între structura chimică și gradul de organizare a polinucleotidelor implicate, determinante pentru funcția pe care o au de îndeplinit.

Din cele de mai sus reiese că problema analizei genomului poate fi abordată din mai multe unghiuri de vedere, la diferite nivele, prin mijloace specifice: cel al cunoașterii exprimării feno- și genotipice (prin metode biologice) și cel al aprofundării alcătuirii suportului material al caracterelor ereditare sau dobândite. Progresele realizate în biochimie, introducerea unor tehnici moderne și fine de analiză au permis trecerea de la aspectele morfologice la cele moleculare ale acizilor nucleici purtători de informație genetică.

Rolul, precum și specificitatea funcțională a acizilor nucleici au la bază structura acestor molecule, care poate fi analizată folosind un algoritm de lucru dependent de scopul propus:

- cunoașterea ***structurii primare***, adică a secvenței, a succesiunii bazelor azotate, singurele componente variabile ale acizilor nucleici, indiferent de tip (ARN sau ADN), deci a structurii lor chimice. Dar acizii nucleici sunt molecule informaționale, iar simpla cunoaștere a ordinii relative, globale a componentelor este insuficientă pentru înțelegerea funcționării lor. De aceea se impune determinarea secvențelor cu rol în diverse procese: începerea și terminarea transcrierii, începerea și terminarea replicării, poziția regiunilor de reglaj genic etc.;
- cunoașterea ***structurii secundare***, adică a interacțiunilor în plan intra- și intercatenare, stabilite între nucleotide, mai exact între bazele azotate componente, prin punți de hidrogen, pe baza complementarității de tip A::::T(U) și C⁞⁞⁞G; are ca urmare realizarea unor zone ordonate;
- cunoașterea ***structurii terțiare***, adică a relațiilor create între zonele ordonate, ceea ce în cazul moleculelor de acizi nucleici se traduce — între altele — prin stivuirea bazelor, sau altfel spus, prin interacțiunea pe verticală (*stacking*) sau prin dobândirea anumitor conformații (supraspiralarea ADN, „frunza de trifoi“ a ARNt etc.);
- cunoașterea ***structurii cuaternare***, adică aceea a unor agregate supramoleculare, care îndeplinesc anumite funcții biologice.

Pe măsură ce se trece de la nivelele structurale simple spre cele complexe se realizează o creștere a cantității de informație pe care o înmagazinează moleculele respective, în paralel cu scăderea entropiei entităților implicate.

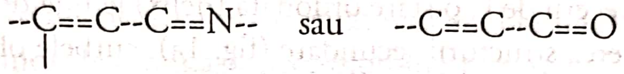
Cunoașterea în detaliu a structurii diverselor genoame va permite atât buna înțelegere a transmiterii caracterelor ereditare, cât și stabilirea mecanismelor de apariție a variațiilor individuale, cu aspect normal sau patologic. De asemenea, va deschide noi perspective pentru corectarea unor defecte sau maladii gen(et)ice, oferind posibilitatea aplicării unor terapii specifice.

În cele ce urmează sunt expuse câteva din metodele cele mai uzuale pentru studiul acizilor nucleici, molecule purtătoare de informație ereditară. Pentru a permite o parcurgere mai ușoară a materialului, tehnicile au fost tratate separat, dar nu exhaustiv, prezentându-se principiile lor de bază și nu protocoale de lucru. Trebuie de la început menționat că analiza genomurilor presupune îmbinarea mai multor tipuri de tehnici, în vederea obținerii rezultatelor urmărite.

2. ANALIZA SPECTROFOTOMETRICĂ

Printre primele metode de analiză a acizilor nucleici, metode care au oferit informații cu privire la structura și concentrația moleculelor respective, au fost și cele optice. Cercetările spectrofotometrice prezintă un deosebit interes pentru stabilirea proprietăţilor fizico-chimice ale acizilor nucleici, aşa încât determinarea spectrului de absorbţie a soluţiilor lor în domeniul UV-B şi o parte a UV-C ($\lambda = 200–300$ nm) constituie una dintre principalele metode de caracterizare. Curba obţinută oferă şi posibilitatea calculului concentraţiei probei respective, precum şi aprecierea purităţii aproximative a preparatelor examinate.

Bazele purinice şi pirimidinice sunt singurele componente ale moleculelor de acizi nucleici (ARN sau ADN) care absorb în UV, în jurul lungimii de undă de 260 nm. Întrucât aceşti compuşi conţin grupări cromofore ionizabile:



$$\text{--}\underset{|}{C}\text{==C--C==N--} \quad \text{sau} \quad \text{--C==C--C==O}$$

studiile trebuie întreprinse în condiţii riguros controlabile de *p*H şi tărie ionică. În funcţie de pH, maximul de absorbţie se deplasează până la 10 nm, înregistrându-se de asemenea variaţia amplitudinii extincţiei, datorită disocierii grupărilor >C=O şi —NH_2, conform echilibrelor:

Cromoforul moleculelor de acizi nucleici este o rezultantă a interacţiunii între sistemele conjugate menţionate şi restul moleculei, la care se adaugă efectul disocierii grupărilor funcţionale.

Moleculele de acizi nucleici au maximul de absorbţie în UV la 260 nm, iar minimul la 234 nm. De la caz la caz, la diverşi acizi nucleici, apar deplasări de 1–3 nm ale maximului sau minimului de absorbţie.

Totalitatea cercetărilor efectuate asupra proprietăţilor optice ale acizilor nucleici au permis să se tragă câteva concluzii:

a) pornind de la observaţia că soluţiile de acizi nucleici în stare nativă au o absorbţie cu 25–30% mai mică decât suma absorbţiei moleculare a mononucleotidelor componente, s-a ajuns la concluzia că hidroliza legăturilor 3',5'-fosfodiesterice, precum şi desfacerea punţilor de hidrogen ca urmare a acţiunii diferiţilor agenţi fizici (căldură, radiaţii etc.) sau chimici şi biologici (alcalii, aldehide, enzime etc.) duce la o creştere a valorilor absorbţiei (efect hipercrom);

b) ca revers, în urma refacerii legăturilor covalente sau a punţilor de hidrogen, se înregistrează o scădere a absorbţiei acizilor nucleici, adică se produce un efect hipocrom al absorbţiei, cu 20–25%;

c) formarea şi desfacerea legăturilor de hidrogen, deci modificarea structurii secundare, sunt însoţite de modificări ale valorilor spectrelor de absorbţie, în special ca urmare a interacţiunii orbitalilor electronilor **p** ai ciclurilor aromatice adiacente.

Deoarece aceste efecte depind şi de *p*H-ul mediului de lucru (cel pronunţat alcalin — mai ales, dar şi cel extrem de acid induc modificări ale cromoforilor implicaţi sau pot provoca hidroliza lanţului polinucleotidic), studiile spectrofotometrice asupra acizilor nucleici, în special când se urmărește determinarea concentrației produsului de analizat, trebuie realizate la un *p*H în jurul valorii 7,5 (7,2–7,8).

Structura dublu helicoidală a ADN sau cea a zonelor ordonate din ARN nu se menține în orice condiții: creșterea temperaturii duce la desfacerea punților de hidrogen. Astfel, în cursul încălzirii soluțiilor de ADN, până la o anumită temperatură, valoarea absorbției rămâne relativ constantă, apoi se observă o creștere bruscă a densității optice. Aspectul curbei — numită de *tranziție termică a unui ADN*, pe seama trecerii de la o stare ordonată (helix) la una dezordonată (ghem) — permite aprecierea structurii secundare (fig. 1a); curbele obținute la tranziția termică sunt specifice produsului studiat.

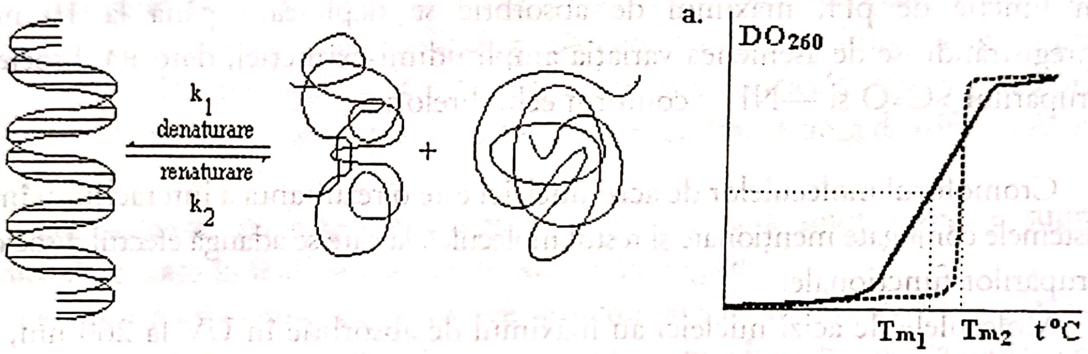


Fig. 1 — Denaturarea termică a acizilor nucleici (ADN): a. determinarea T_m; b. tranziția helix-ghem.

Temperatura la care lanțurile sunt desfăcute în proporție de 50% se numește ***temperatură de topire*** (T_m) și este o expresie a conținutului de G+C; există o relație direct proporțională între G+C și temperatura de topire (fig.2).

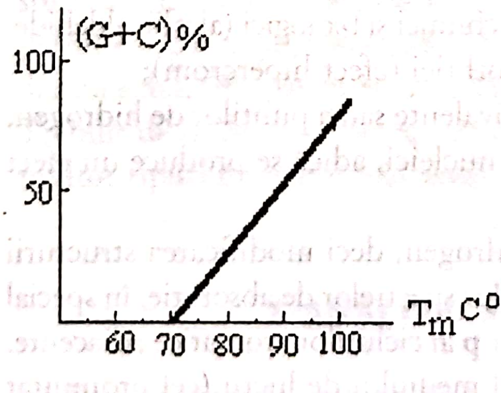


Fig. 2 — Dependența T_m de procentul G+C.

Răcirea lentă a soluțiilor de ADN supuse denaturării termice duce la renaturare (fig. 1b), la reversia procesului, dar apare o decalare între curbele celor două sensuri de variație a parametrului termic, cu instalarea fenomenului de *histereză*. Deoarece în unele procese biologice (transcriere, recombinare genetică — pe parcursul cărora are loc desfacerea-refacerea dublului helix) intervine fenomenul de histereză, cunoașterea lui devine necesară. Dacă răcirea soluțiilor de acizi nucleici de la circa 100°C (temperatura băii de apă la fierbere) se face brusc, catenele „îngheață“ sub forma unor gheme încolăcite întâmplător (*random coiled*), fără renaturare.

Diferența constatată la tranzițiile ordine(helix)-dezordine(ghem) ale moleculelor de acizi nucleici — mai ales în cazul ADN — este condiționată de cineticile celor două procese; apare nu numai la modificarea temperaturii, ci și a *p*H sau a tăriei ionice, dacă se păstrează constanți ceilalți parametri de mediu, pe seama caracterului de polielectrolit al moleculelor polinucleotidice.

Asupra fenomenului de denaturare-renaturare s-au întreprins mai multe studii cinetice pe baza unor determinări spectrofotometrice, stabilindu-se că:

- în condițiile denaturării termice parțiale, renaturarea este rapidă și totală, cu respectarea unei cinetici de ordinul I;
- la denaturarea totală, reasocierea catenelor are loc incomplet, pe parcursul unui proces mai îndelungat, care prezintă două etape. Prima implică formarea lentă a unor „nuclee“ de complementaritate pe cele două catene, urmărind o cinetică de ordinul II. Cea de a doua etapă, mai alertă, respectă o cinetică de ordinul I.

Dacă se consideră concentrația ADN denaturat ca fiind $\mathbf{c_0}$ (exprimată în moli P_{ADN}/l), modificarea concentrației **c** a ADN monocatenar la un moment dat **t** va fi:

$$dc/dt = k_2c^2$$

sau, prin integrare:

$$c/c_0 = 1/(1+k_2c_0t)$$

astfel încât renaturarea moleculei ADN poate fi apreciată pe baza variației raportului concentrațiilor în funcție de $\mathbf{c_0t}$. Valoarea constantei k_2 este caracteristică fiecărui ADN și este invers proporțională cu numărul perechilor de baze din secvențe unice în acidul nucleic. Pentru evaluarea gradului de organizare a ADN a fost propus raportul $\mathbf{c_0t/2}$, denumit „grad de complexitate“, și care se determină pentru un ADN dat prin referire la ADN standard; de obicei, standardul este reprezentat de ADN *E. coli* având $4{,}2 \times 10^6$ perechi de baze cu secvență unică, nerepetată, astfel că se admite relația:

$$\frac{\text{complexitatea ADN}}{4{,}2 \times 10^6} = \frac{c_0t/2 \text{ ADN}}{c_0t/2 \text{ ADN } \textit{E. coli}}$$

de unde:

$$\text{complexitatea ADN} = \frac{4{,}2 \times 10^6 \times c_0t/2 \text{ ADN}}{c_0t/2 \text{ ADN } \textit{E. coli}}$$

Determinările spectrofotometrice sub acțiunea unor factori fizico-chimici permit obținerea de informații privind gradul de dispersie a macromoleculelor implicate.

Pe baza datelor experimentale se poate calcula o serie de valori — parametri care pot da indicații asupra arhitecturii macromoleculelor respective și asupra relativei lor purități:

a) $A_{280}/A_{260} = 0,55$ pentru ADN (sau $A_{260}/A_{280} = 1,72–2,00$) față de 0,47–0,49 pentru ARN sau1,75 pentru proteine;

b) din valoarea absorbției la $\lambda = 260$ nm se calculează concentrația, folosind regula de trei simplă, ținând cont de diluția soluției de acid nucleic, precum și de grosimea cuvei de cuarț în care se efectuează determinările. Prin definiție, s-a acceptat că o soluție de ADN (bicatenar) cu o concentrație de 1 mg (1000 µg)/ml, în tampon Tris 0,02M *p*H 7,5, în cuvă de cuarț cu un drum optic de 1 cm, absoarbe 20 UDO_{260} (unități de densitate optică, la 260 nm). In condiții similare, aceeași cantitate de ARN (monocatenar) are o absorbție de 25 UDO_{260};

c) aprecierea conținutului în zone dublu catenare se face prin calculul creșterii totale a hipercromicității R_Δ, definită prin:

$R_\Delta = (A_{max} — A_{22})/A_{22}$

la ADN, R_Δ are o valoare spre 50%; deoarece acest parametru prezintă unele variații, este utilizat mai rar;

d) temperatura de tranziție sau de topire T_m, calculată din:

$Tm = 0,5R_\Delta = (A_t — A_{22})/A_{22}$

unde A_t este absorbția la temperatura la care este satisfăcută relația, iar A_{22} absorbția la temperatura camerei;

e) lățimea tranziției Δ 2/3, adică zona de temperatură pentru care

$(A_r — A_{22})/A_{22} = 0,5 \pm 0,33\ R_\Delta$

ceea ce permite aprecierea heterogenității repartizării zonelor ordonate ale moleculei.

3. ELECTROFOREZA

Electroforeza este o metodă care permite moleculelor încărcate electric să migreze în câmp electrostatic spre polul de semn contrar. Moleculele de polinucleotide (ribo- sau deoxi-) se comportă ca polianioni, indiferent de *p*H-ul tamponului utilizat la separare. În absența unor forțe externe, moleculele de acizi nucleici se află în stare relaxată în soluție, prezentând o mișcare browniană. La intervenția câmpului electric, moleculele polianionice de acizi nucleici (datorită catenei polifosfat) se vor alungi, căpătând o mișcare de „târîre“ spre anod. Viteza de migrare — denumită ***mobilitate electroforetică*** — este dependentă de dimensiunile moleculei și de conformația acesteia.

Echilibrul dinamic dintre forța cîmpului electric aplicat și forța de reținere produsă de mișcarea unei molecule de o anumită conformație și dimensiune prin gelul de separare determină mobilitatea, dependentă de mai mulți parametri:

$$\mu = \frac{Qd}{4\pi r^2 \eta}$$

unde μ — mobilitatea moleculei;
Q — sarcina netă a moleculei;
d — distanța dintre electrozi;
r — raza (dimensiunea) moleculei;
η — viscozitatea soluției.

Pentru electroforeză se pot folosi geluri de poliacrilamidă, agaroză sau mixte. Întrucât gelurile de agaroză dau o rezoluție de bună calitate a speciilor de acizi nucleici, sunt transparente în UV și sunt ușor de realizat și manevrat, ele sunt cele mai folosite.

Agaroza, polizaharid extras dintr-o variatate de alge roșii, este un polimer al unei unități dizaharidice; la încălzire în soluții apoase formează hidrosoli, care la răcire se transformă în hidrogel.

Parametrii electroforezei. Când ADN este supus gel electroforezei, moleculele respective sunt obligate să migreze prin interstițiile rețelei spre anod, cu o viteză de migrare care depinde de următoarele caracteristici:

- *masa moleculară.* Există o relație de proporționalitate inversă între mobilitate și logaritmul masei (fig.3), dar relația este valabilă doar pentru moleculele liniare având sub 20 kb. Migrarea moleculelor mari este aproape independentă de mărime, astfel încât nu se mai observă relația de liniaritate;
- *conformația* (liniară L, cerc deschis CD/OC — *open circle*, cerc covalent închis CCI/CCC — *covalently closed circle*). La aceeași masă, moleculele CCI au cea mai mare mobilitate, pe când conformația CD este cea mai lentă. Moleculele liniare au o mobilitate intermediară, comparativ cu celelalte două specii;

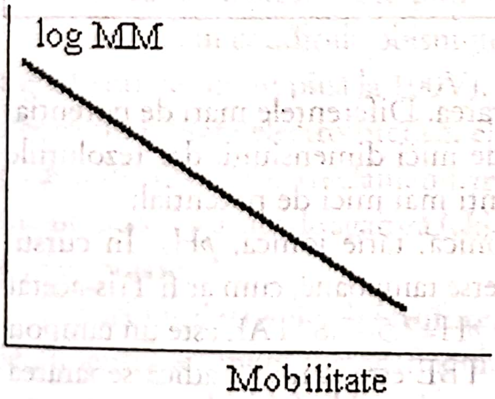


Fig. 3 — Dependența mobilității electroforetice de logaritmul masei moleculare.

- *porii gelului* (în funcție de concentrația gelului). Pot fi predeterminați prin ajustarea concentrației: cu cât gelul este mai diluat, porii sunt mai mari și reciproca. Un fragment de acid nucleic de o anumită dimensiune va migra cu mobilități diferite în geluri de concentrații diferite, dependență exprimată prin ecuația:

$$\log \mu = \log \mu_0 - K_r \tau$$

unde

μ — mobilitatea electroforetică a ADN în gel;

μ_0 — mobilitatea electroforetică liberă (adică în soluție);

K_r — coeficientul de întârziere (în funcție de forma și dimensiunea moleculelor);

τ — concentrația de agaroză din gel.

De obicei, moleculele mari de ADN (15–40x10^6Da) sunt separate în geluri cu concentrații mici (0,3–0,5%), pe când cele mici — pînă la 10x10^6D sunt bine rezolvate în geluri cu dimensiuni reduse ale porilor, la concentrații de 0,7–1,0% sau chiar până la 2–3% (tabelul 1):

Tabelul 1 — Capacitatea de separare a ADN pentru diferite geluri de agaroză

Concentrația agarozei (%)	Domeniul de separare a moleculelor de ADN bicatenar (kb)
0,3	60–5
0,6	20–1
0,7	10–0,8
0,9	7–0,5
1,2	6–0,4
1,5	4–0,2
2,0	3–0,1

- *gradientul de potențial* la care are loc migrarea. Diferențele mari de potențial sunt utilizate pentru separarea fragmentelor de mici dimensiuni, dar rezoluțiile cele mai bune se înregistrează totuși la gradienți mai mici de potențial;
- *tamponul de electroforeză* (compoziție ionică, tărie ionică, *p*H). În cursul electroforezei pe gel de agaroză se pot folosi diverse tampoane, cum ar fi Tris-acetat (TAE), Tris-borat (TBE) sau Tris-fosfat (TPE) *p*H=7,5–7,8. TAE este un tampon mai „leneș“ care necesită recirculare, pe când TBE este „rapid“, adică separarea speciilor de ADN are loc cu viteze mai mici sau mai mari. Pe măsură ce crește tăria ionică, proporțională cu concentrația ionilor, aceștia vor transporta mai mult curent, ceea ce va avea ca efect frânarea mobilității moleculelor de separat și se va traduce printr-o separare mai netă a speciilor de analizat.

În general, se recomandă adaptarea condițiilor de electroforeză la circumstanțele specifice ale fiecărui experiment. Comportarea electroforetică a acizilor nucleici în gelurile de agaroză nu depinde practic de compoziția în baze sau de temperatură. Mobilitatea relativă a fragmentelor de ADN nu se modifică în domeniul 4^0-30^0C.

Gelurile de agaroză de concentrații variate se pot utiliza în dispozitive verticale sau orizontale (care sunt cele mai comode la lucru). După migrarea speciilor de acizi nucleici evidențierea lor se face prin colorare cu bromură de etidiu (EtBr), care se poate adăuga și în gel, fiind astfel facilitată urmărirea migrării și observarea la transiluminator. EtBr, colorant cationic, se intercalează între perechile de baze ale acizilor nucleici; se formează un „sandwich“, iar ca urmare a excitației cu lumină UV λ=320 nm, se emite o radiație de fluorescență de culoare roșie-portocalie; concentrația critică de EtBr este de 0,1–0,5 μg/ml. Limita de detectabilitate directă este de 1 ng (10^{-9}g) ADN. Detecția fragmentelor de acizi nucleici separați electroforetic se poate efectua și prin alte mijloace cum ar fi autoradiografia, în cazul marcării cu radioizotopi ^{32}P, ^{35}S (radiație β), ^{125}I (radiație γ) și, mai rar, ^{14}C sau ^{3}H (radiație β moale).

La același număr de perechi de baze per fragment, mobilitatea depinde de conformația moleculară, așa după cum s-a menționat deja. O metodă de identificare a diverselor conformații recomandă utilizarea în gel a unor concentrații crescânde de EtBr. Cu cât există mai mult colorant, cu atât se va lega mai mult la ADN. Supraspiralarea spre stânga a moleculei circulare va fi treptat despiralată, micșorându-se mobilitatea speciei respective, din cauza relaxării. La o concentrație critică de colorant, când nu mai există suprarăsuciri, viteza de migrare va atinge o valoare minimă limită. Un plus de EtBr va provoca o supraspiralare spre dreapta, iar mobilitatea va crește corespunzător.

În general, în condițiile obișnuite de electroforeză (în câmp cu orientare unică la gradienți de curent pînă la 100V), moleculele mai mari de 20 kb prezintă practic aceeași mobilitate electroforetică, ele neputând fi separate, chiar dacă se recurge la câmpuri mai slabe (reclamând zeci de ore pentru efectuarea electroforezei) și la concentrații scăzute de agaroză (chiar 0,1%, ceea ce ridică probleme de consistență la manipulare etc.).

Tipuri moderne de electroforeză. Pentru depășirea unor handicapuri legate de dimensiunea moleculelor (fragmentelor) de separat sau pentru obținerea unor răspunsuri rapide privind înrudirea anumitor secvențe din genomuri diferite, s-au căutat alte condiții de efectuare a electroforezei.

S-a pornit de la observația că prin întreruperea câmpului electric, molecula de ADN alungită se relaxează ajungând la configurația sa de „repaus“, timpul necesar acestui proces fiind dependent de dimensiunile moleculei respective. Pe baza acestei observații s-au imaginat diverse alte sisteme de electroforeză. Într-o primă variantă, a fost propusă electroforeza bidimensională: moleculele din probă sunt supuse unei migrări clasice de la catod spre anod, ceea ce permite o primă separare; ulterior, asupra gelului se aplică un alt câmp, cu aceiași parametri, dar perpendicular. Ca rezultat, fragmentele de acizi nucleici obținute prin digestia enzimatică nespecifică pot fi separate mult mai eficient decât prin electroforeza monodimensională.

De aici până la ideea că schimbarea periodică a orientării câmpului electric va forța moleculele de ADN de dimensiuni mari să sufere alternativ o relaxare la întreruperea unui câmp urmată de o nouă alungire la aplicarea unui câmp nou nu a mai fost decât un pas. Repetarea acestui „modul" s-a dovedit a fi eficientă în separarea unor molecule având chiar câteva sute de kpb. Întrucât moleculele mari sunt mai „leneșe" din punct de vedere al reorientării comparativ cu moleculele mai mici, atunci când în probă vor fi mai multe fragmente -în urma aplicării alternative a unor câmpuri cu durate și tensiuni identice — ele vor putea fi separate, aspectul final fiind dat de rezultanta multiplelor și scurtelor zig-zaguri de migrare.

Astfel a apărut **gel electroforeza în câmp pulsator** (*pulse field gel electrophoresis* — PFGE) ai cărei parametri sunt:

- câmpul pulsator — constând în cel puțin două câmpuri care acționează alternativ;

- intervalul de acțiune (de pulsare) — perioada de timp în care acționeză fiecare câmp;

- unghiul de reorientare — unghiul sub care sunt aplicate câmpurile pulsatoare (de 90^0, perpendiculare sau sub orice alt unghi, în funcție de geometria dispozitivelor de lucru, adică de geometria polilor/electrozilor);

- inversiunea câmpului — uneori, unghiul de reorientare poate fi de 180^0, ceea ce presupune o mișcare de „recul" a moleculelor deja separate într-o primă etapă.

Fiecare dintre aceste sisteme prezintă anumite avantaje, legate de gradul de rezoluție a benzilor, dar și dezavantaje, mai ales cele privitoare la logistica necesară.

De fapt, sub sigla PFGE au fost elaborate de-a lungul anilor numeroase sisteme, desemnate — la rândul lor — cu acronime specifice (tabelul 2).

În mediu alcalin, structura ordonată bicatenară a acizilor nucleici se desface. Denaturarea moleculelor de ADN la pH>10, în prezența NaOH 0,02M, la 37^0C, care are loc conform schemei din fig.4, permite stabilirea conformațiilor în care se află moleculele respective în anumite condiții sau ca urmare a tratamentelor la care sunt supuse.

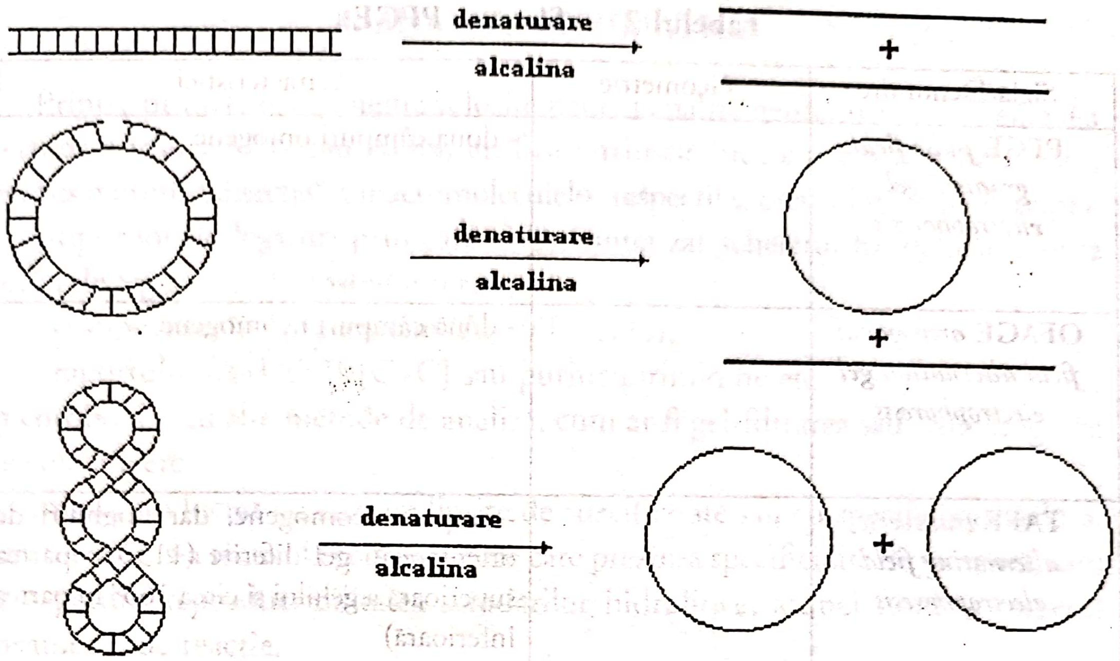


Fig. 4 — Denaturarea alcalină a moleculelor de ADN cu diferite conformații.

De exemplu, după interacțiunea ADN cu droguri și/sau factori fizico-chimici care induc apariția unor legături covalente de tip *cross-link* între catenele polinucleotidice, cele două lanțuri rămân solidare și nu se mai desfac prin creșterea *p*H peste 10, pe când moleculele în care nu s-au format legături covalente se vor denatura. Astfel, din ADN liniar dublu catenar vor rezulta două monocatene liniare, din OC — o monocatenă liniară și un cerc monocatenar, iar din CCI — două cercuri monocatenare.

O aplicație a tehnicii de separare electroforetică, ce presupune aspecte legate de denaturarea-renaturarea dublului helix, cu posibila apariție de molecule hibride (heteroduplexuri) este așa numita **determinare a mobilității electroforetice a heteroduplexurilor** (*heteroduplex mobility assay*). Aceasta este una dintre cele mai rapide metode de decelare și estimare a divergenței genetice dintre genotipuri și se bazează pe observația că heteroduplexurile de ADN formate între secvențele înrudite prezintă, în geluri, preferențial de poliacrilamidă <5% sau, mai rar, agaroză >3%, o mobilitate electroforetică redusă, în funcție de gradul de divergență. Protocolul de lucru prevede denaturarea termică a amestecului de secvențe nucleotidice înrudite (la concentrații egale), în tampon adecvat și renaturarea pe gheață. Heteroduplexurile formate au mobilitate electroforetică intermediară față de catenele „parentale".

Tabelul 2 — Sisteme PFGE

Siglă/Denumire	Geometrie	Caracteristici
PFGE ***pulse field gradient gel electrophoresis***		- două câmpuri omogene
OFAGE ***orthogonal field alternation gel electrophoresis***		- două câmpuri neomogene
TAFE ***transverse alternating field electrophoresis***		-câmpuri neomogene, dar unghiuri de orientare în gel diferite (115^0 în partea superioară a gelului și circa 165^0 în partea inferioară)
FIGE ***field inversion gel electrophoresis***		- câmp omogen, cu inversiuni de durată sau cu gradient de potențial diferite
CHEF *(contour)* ***clamped homogeneous electric field***		- câmpuri omogene, obținute cu ajutorul unor electrozi multipli, aranjați pe un contur hexagonal (cu unghi de reorientare de 60^0 sau 120^0; schimbând conturul se pot obține și alte unghiuri)
RGE ***rotating gel electrophoresis (cross-field gel electrophoresis)***		- câmp omogen; separarea depinde de viteza de rotire și unghiul sub care se află gelul.
PACE ***programmable autonomously controlled electrodes***		- permite generarea unui număr nelimitat de câmpuri electrice de omogenitate, gradient de potențial, orientare și durată perfect controlabile.
ZIFE ***zero integrated field electrophoresis*** etc.		- variantă a FIGE, în care raportul (gradient de potențial x timp acțiune „înainte“)/(gradient de potențial x timp acțiune „invers“) ≈ 1

4. ANALIZA ENZIMATICĂ

Printre primele instrumente folosite pentru analiza genomurilor, în general a acizilor nucleici ARN sau ADN, au fost enzimele hidrolitice a căror acțiune a permis o primă „disecție“ a macromoleculelor respective, oferind informații asupra:

- tipurilor de legături prin care a fost sintetizat scheletul fosfoglucidic (este vorba de legături 3',5'-fosfodiesterice);
- compoziției în baze azotate (A, U/T, C, G);
- raportului [A+U(T)]/[G+C] sau purine:pirimidine etc.

în coroborare cu alte metode de analiză, cum ar fi gel-filtrarea sau cromatografia pe coloane etc.

Inițial, s-a lucrat cu enzime lipsite de specificitate sau cu specificitate redusă, dar, ulterior, s-a recurs la endonucleaze care prezintă specificitate de secvență, ceea ce a permis reproductibilitatea scindărilor hidrolitice, atunci când se respectă parametrii de reacție.

4.1. HIDROLIZA NESPECIFICĂ

Se cunosc numeroase enzime cu acțiune endo- sau exonucleazică, pe acizii nucleici mono- sau bicatenari. La ora actuală, unele dintre acestea nu se mai folosesc pentru analiza genomurilor, dar și-au găsit utilizarea în cadrul diverselor tehnici de biologie moleculară sau la clonarea genelor. În continuare se vor oferi câteva exemple.

4.1.1. Endonucleaze. *RNaza I pancreatică* este o enzimă cu specificitate redusă, ea acționând asupra legăturilor fosfodiesterice adiacente nucleotidelor pirimidinice din zonele monocatenare ale ARN (nu atacă ARN dublu catenar și nici zonele ordonate ale ARN monocatenar). Rezultatul final al hidrolizei este reprezentat de un amestec de mononucleotide pirimidinice și oligonucleotide purinice terminate tot cu pirimidine, conform schemei din fig. 5a.

Studiile de hidroliză enzimatică a ADN au început tot cu nucleaze nespecifice. Între acestea, folosită și astăzi în biologia moleculară (pentru introducerea unor crestături necesare în reacția de *nick*-translație sau pentru realizarea unei singure crestături întâmplătoare pe o moleculă circulară în vederea obținerii unor situsuri sensibile în procesul de mutageneză mediat de bisulfit), este *DNaza I pancreatică*. Ea își desfășoară acțiunea atât pe ADN monocatenar, cât și pe ADN bicatenar, cu eliberarea de 5'-fosforiloligodeoxinucleotide, prin desfacerea legăturilor 3',5'-fosfodiesterice.

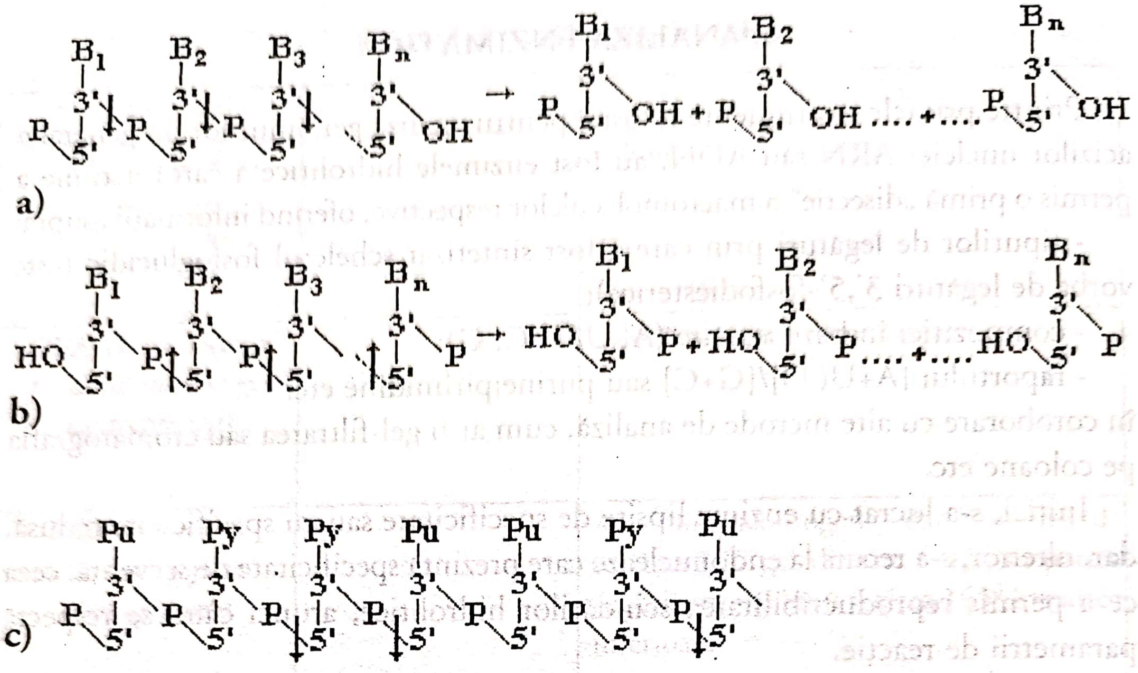


Fig. 5 — Hidroliza enzimatică nespecifică: a. cu RNază I; b. cu 5'-fosfodiesterază ; c. cu 3'-fosfodiesterază.

Nucleaza S1 acționează mai ales ca exonuclează, deși prezintă și activitate endonucleolitică asupra acizilor nucleici monocatenari (ARN și ADN). Această proprietate este speculată atât pentru analiză, cât mai ales pentru îndepărtarea extensiilor din acizii nucleici cu structură bicatenară fie ADN-ADN, fie ADN-ARN.

4.1.2. Exonucleaze. Aceste enzime au o specificitate de substrat și mai redusă decât endonucleazele și își exercită acțiunea pe ambele tipuri de acizi nucleici.

Încercările inițiale de stabilire a structurii primare a acizilor nucleici, de fapt în primul rând a ARN, au folosit inclusiv exonucleazele, între acestea *fosfodiesterazele* cu acțiune fie de la capătul 5'-fosfat, fie de la cel 3'-OH. Astfel, fosfodiesteraza din veninul de șarpe desface succesiv nucleozid-5'-fosfați, indiferent de natura lor pirimidinică sau purinică (fig. 5b). Reacția are dezavantajul că este greu controlabilă, în vederea urmăririi pas cu pas a nucleotidelor eliberate prin hidroliză.

Aceleași probleme le ridică și fosfoesterazele care scindează treptat nucleozid-3'-fosfații conform schemei din fig. 5c.

Exonucleaza fagului λ constituie încă un instrument util în analiza structurii ADN, începând hidroliza preferențial cu capătul 5'-fosfat și ajutând la determinarea secvențelor aflate în zona respectivă.

Bal31 este o exonuclează care acționează bidirecțional pe o moleculă de ADN dublu catenar, viteza reacției de hidroliză pe care o catalizează fiind dependentă de secvență, ceea ce o face să prezinte variații care pot fi apoi interpretate din punct de vedere al nucleotidelor scindate. Această enzimă s-a dovedit foarte utilă în operațiunile de reducere a dimensiunilor fragmentelor ADN și de deleție predeterminată a anumitor regiuni din molecula de ADN.

În general, enzimele cu specificitate redusă sau absentă sunt mai puțin folosite acum în analiza genomurilor, deși informațiile obținute cu ajutorul lor sau modificările operate de ele, la nivelul acizilor nucleici, în alte scopuri decât cele analitice, prezintă importanță. Dezavantajul lucrului cu acest tip de enzime este reprezentat de dificultatea controlului asupra proceselor pe care le catalizează.

4.2. HIDROLIZA SPECIFICĂ

4.2.1. Enzimele de restricție. Descoperirea enzimelor de restricție a oferit biologiei moleculare un instrument foarte precis de hidroliză reproductibilă a macromoleculelor de ADN. In acest moment se cunosc circa 1 000 de endonucleaze restrictive, având — de obicei — asociate și enzime de modificare (de metilare). Pe baza câtorva caracteristici (mecanismul de acțiune, condiționat de tipul situsului/lor de recunoaștere/scindare, necesitatea participării unor cofactori (precum S-adenozil-metionina SAM și ATP) au fost grupate în trei clase. Dintre acestea, enzimele de restricție și modificare de tip II — utilizate pentru stabilirea hărții fizice a ADN, dar și pentru „decuparea“ anumitor fragmente moleculare necesare la clonare sau pentru alte manipulări — acționează în absența cofactorilor, solicitând totuși prezența ionilor Mg^{2+}, iar cele două activități sunt localizate pe suporturi proteinice diferite.

De obicei, enzimele de restricție de tip II hidrolizează ADN în interiorul secvenței specifice pe care o recunosc (cu unele excepții, lângă). Cel mai adesea, aceasta conține 4–6 perechi de baze și are o structură palindromică, a cărei caracteristică este prezența unei axe de dublă simetrie. Au fost identificate circa 140 de secvențe specifice pentru endonucleazele de restricție de tip II, ceea ce face ca mai multe enzime să recunoască și să taie aceeași secvență (fiind numite *izoschizomere*). Unele enzime produc capete cu extensii 5' sau 3' (capete coezive sau lipicioase, *sticky ends*), altele dau naștere la capete netede (*cohesive ends*).

Calculul probabilităților arată o frecvență de apariție întâmplătoare a palindromului tetranucleotidic odată la 256 perechi de baze, ceea ce face ca în urma clivării duplexului ADN cu enzimele de restricție care au în situsul de recunoaștere secvențe tetranucleotidice să apară fragmente moleculare mai mici.

Secvența tetranucleotidică de recunoaștere poate fi inclusă în secvențe hexanucleotidice, dar în acest caz probabilitatea de a întâlni un astfel de situs scade și mai mult, numărul de fragmente de restricție fiind și el mai redus. Unele enzime fac excepție de la regulă, hidrolizând ADN din celulele eucariote cu o frecvență mult mai mică decât cea calculată, probabil datorită faptului că ADN de eucariote are o proporție relativ redusă de dinucleotide CG, care se află în centrul de recunoaștere al acestor enzime.

În cazul ARN nu există un corespondent al enzimelor de restricție. Se cunosc totuși unele enzime cu specificitate mai înaltă, enzime utilizate pentru stabilirea structurii primare a ARN. În plus, există posibilitatea „analizei de restricție“ a ARN, efectuând reacțiile respective pe ADNc corespunzător și obținând astfel pe cale indirectă o serie de informații.

4.2.2. Stabilirea hărții fizice a ADN. Hidroliza cu enzime de restricție permite stabilirea unor hărți, privind pozițiile relative ale fragmentelor rezultate de-a lungul macromoleculei polideoxiribonucleotidice, adică se pune problema localizării fragmentelor în raport cu ADN din care provin. În practică, aceasta este ușor de realizat, utilizând două sau mai multe enzime de restricție și următorul raționament: molecula de ADN este hidrolizată succesiv cu enzimele E1 și E2 (fig. 6); în urma scindării cu E1 se presupune că au apărut mai multe fragmente, printre care și cel care trebuie localizat (E1$_{a}$). Acesta este izolat electroforetic și apoi hidrolizat cu E2, obținîndu-se alte fragmente (E2$_{a}$, E2$_{b}$ etc.). Pentru a localiza fragmentul E1$_{a}$ este nevoie de identificarea fragmentelor generate de E2, care hidrolizat cu E1 să producă fragmentele E2$_{a}$, E2$_{b}$, E2$_{c}$ etc. Din aproape în aproape, prin raționamente bazate pe posibilitatea aranjamentului reciproc al fragmentelor rezultate la restricție, se poate aprecia localizarea unei anumite secvențe în ansamblul macromoleculei studiate. De obicei, se face marcarea cu ^{32}P a capetelor ADN inițial și apoi se trece la analiza de restricție.

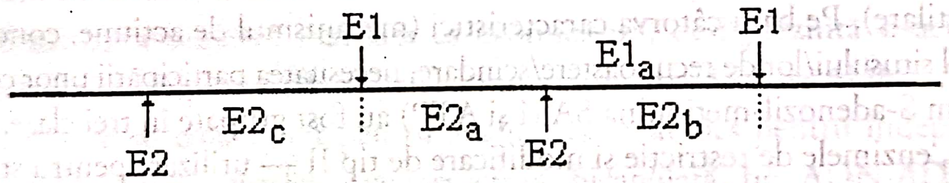


Fig. 6 — Schema de determinare a hărții fizice a ADN.

4.3. FINGERPRINTING

Fingerprinting sau cartografierea genomului prin metoda amprentelor constă în obținerea unei hărți oligonucleotidice. Se folosește atât pentru identificarea genomului, cât și pentru stabilirea variațiilor sale genetice. „Amprenta“ (aspectul) se obține printr-o tehnică de comparare a unor indivizi (genomuri) prin genotipare moleculară, efectuată cu mijloace adecvate pentru genomuri ARN (corespunzătoare unor virusuri) sau ADN (unele genomuri virale, dar toate genomurile pro- și eucariote).

În scopul determinării fingerprint, acidul nucleic izolat de la un anumit individ este supus hidrolizei enzimatice (nespecifice — pentru ARN, cu enzime de restricție — la ADN), iar fragmentele rezultate sunt separate electroforetic și evidențiate prin alte tehnici, cum ar fi autoradiografia directă (dacă s-a lucrat pe material inițial marcat radioizotopic) sau hibridizarea de tip Northern/Southern cu sonde specifice (marcate radioactiv — cu detecție prin autoradiografie sau „la rece“ — cu detecție imunoenzimatică colorimetrică sau prin chemiluminiscență). Ca urmare, se obține o anumită distribuție de benzi (sau „pete“), specifică și unică pentru individul analizat. Pentru hibridizare se aleg sonde scurte (10–15 nucleotide), de obicei reprezentând secvențe repetitive aflate în copii multiple pe cromozom (din zona cu *tandem repeats*). Comparînd rezultatele obținute asupra fragmentelor de hidroliză enzimatică ce provin de la cel puțin doi indivizi diferiți se poate aprecia gradul lor relativ de înrudire. Fingerprinting pentru ADN oferă o bază statistică pentru evaluarea probabilității ca anumite probe de sânge, spermă, păr sau țesut să aparțină unui individ dat. De asemenea, acestea constituie o bază în vederea stabilirii genealogiei/paternității animale sau umane.

4.3.1. Fingerprinting (amprentare) ARN. La ARN, fingerprinting se realizează astfel: se marchează capătul 5’ al genomului/fragmentului de studiat (se preferă marcarea radioactivă, utilizând $[^{32}\mathrm{P}]$-γ-ATP), apoi se procedează la hidroliză enzimatică, folosind de exemplu RNaza T1, care scindează la G. Ca urmare, apar fragmente de 1–40 nucleotide, care sunt separate electroforetic în gel de agaroză/poliacrilamidă, întâi monodimensional — asigurând departajarea pe baza sarcinilor fragmentelor și apoi — dacă se impune o mai clară rezoluție a oligonucleotidelor rezultate — într-o a doua dimensiune, în funcție de masă. După autoradiografie rămâne „amprenta“, care ulterior permite compararea genomurilor între ele, cu aprecierea micilor variații care apar între tulpini sau tipuri de organisme (fig. 7).

Prezența sau absența unor resturi G în moleculă sau amplasarea lor diferită față de molecula de referință va fi înregistrată pe autoradiografie, ceea ce va permite decelarea apariției unor variante/mutante ale tipului de bază.

inv - 158 021

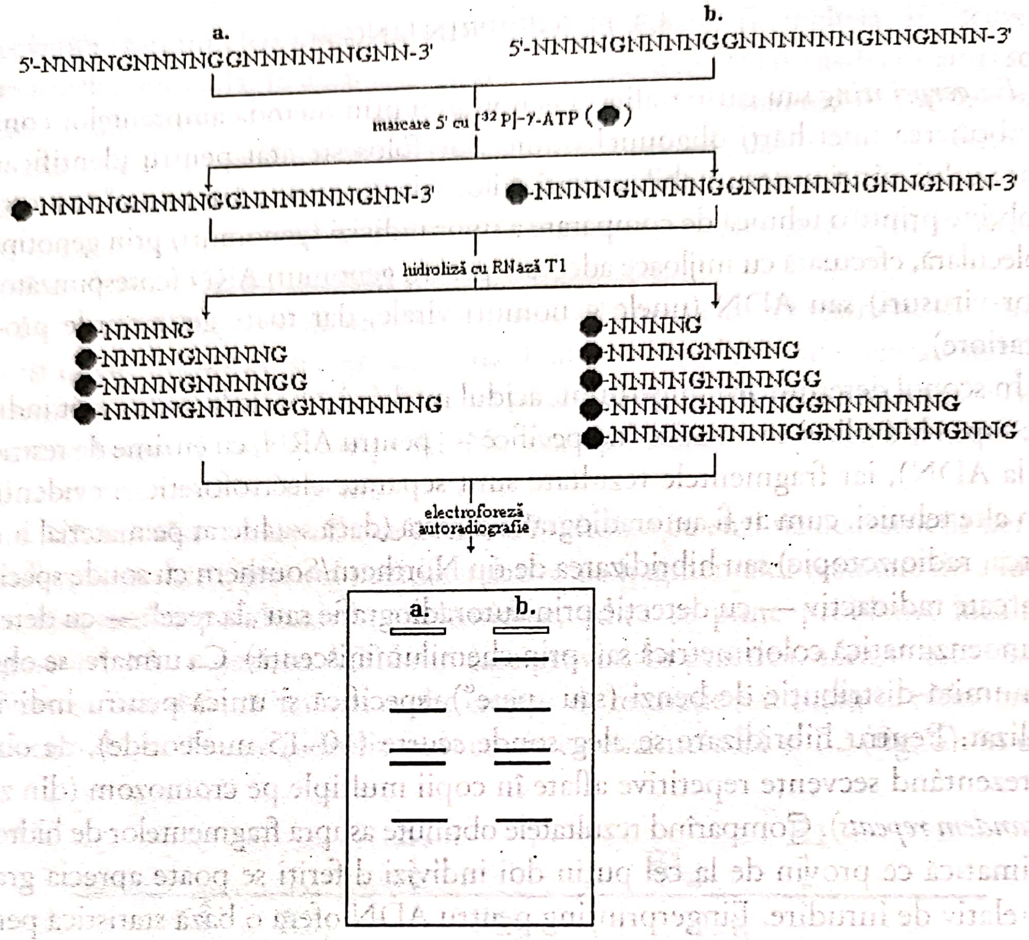

a.
5'-NNNNGNNNNGGNNNNNNNGNN-3'
b.
5'-NNNNGNNNNGGNNNNNNNGNNGNNN-3'
marcare 5' cu [32 P]-γ-ATP (●)
●-NNNNGNNNNGGNNNNNNNGNN-3'
●-NNNNGNNNNGGNNNNNNNGNNGNNN-3'
hidroliză cu RNază T1
●-NNNNG
●-NNNNGNNNNG
●-NNNNGNNNNGG
●-NNNNGNNNNGGNNNNNNNG
●-NNNNG
●-NNNNGNNNNG
●-NNNNGNNNNGG
●-NNNNGNNNNGGNNNNNNNG
●-NNNNGNNNNGGNNNNNNNGNNG
electroforeză
autoradiografie
a.
b.

Fig. 7 — Schema analizei fingerprinting.

În locul RNazei T1, pentru fingerprinting se poate folosi orice altă RNază cu oarecare specificitate (redusă), care hidrolizează acizii nucleici la fragmente de diverse lungimi. Dacă enzima de lucru va fi RNaza T2, izolată tot din takadiastaze (culturi de *Aspergillus oryzae*), scindarea va avea loc numai la legăturile adenozin-3'-fosfat, în final rezultând tot oligonucleotide de diverse lungimi, dar terminate cu un rest adenilic. Atunci când se preferă RNaza pancreatică, ARN va fi tăiat prin atacarea legăturilor internucleotidice dintre grupările 3'-fosforice ale unui nucleotid pirimidinic și grupările 5'-OH ale nucleotidelor adiacente.

4.3.2. Polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție (RFLP). În cazul ADN, tehnica a fost pusă la punct în anii 1980, pentru compararea unor genomuri, prin localizarea unor secvențe nucleotidice identice, iar ulterior și-a găsit aplicabilitatea pentru identificări în cauze judiciare. Cea mai cunoscută metodă de fingerprinting pentru ADN este reprezentată de **polimorfismul lungimii fragmentelor de restricție RFLP** (*restriction fragment length polymorphism*).

Polimorfismul de restricție este definit prin variațiile individuale ale secvenței de ADN relevate de modificările hărții de restricție. RFLP reprezintă un ansamblu sau panel de fragmente specifice de ADN generat din ADN genomic prin digestie endonucleazică adecvată, ce diferă în lungime de la un individ la altul, sau la două alele ale genelor la același individ.

Un RFLP este definit printr-un cuplu sondă-enzimă de restricție și corespunde unei amplasări strict definite în genom, adică unui locus genetic. El se caracterizează prin variabilitate de la un individ la altul și prin transmitere mendeliană, fiind un marker genetic. Anumite zone ale ADN genomic variază la populația din aceeași specie. Aceste regiuni variabile sunt localizate de obicei în ADN care flanchează genele. Deseori variabilitatea în secvența ADN există la nivelul intronilor, alteori variația se află și în exoni, rezultatul final fiind exprimat ca polimorfism. ADN genomic este diploid, fiecare genă repetându-se de două ori într-un anumit locus pe cromozom. Dacă cele două copii ale unei gene diferă una de alta (deci dacă ele sunt polimorfice), atunci sunt considerate alele.

Enzimele de restricție pot detecta secvențe specifice de ADN; când digestia se face cu o anumită enzimă de restricție, sunt generate fragmente de restricție specifice a căror lungime poate fi determinată. Orice variație în lungimea unui fragment de restricție dintr-un locus cromozomal specific poate fi detectat ca RFLP. Alegerea enzimelor este arbitrară. Prioritare sunt enzimele ce prezintă un dublet **CG,** unde citozina este un situs metilabil, susceptibil de a suferi o mutație în **TG** prin dezaminare (mutația $^{m}\mathbf{C} \rightarrow \mathbf{T}$).

În tabelul 3 sunt prezentate rezultatele unui studiu statistic al eficienței diverselor enzime de restricție în cercetarea RFLP.

Tabelul 3 — Enzimele de restricție cele mai eficiente pentru punerea în evidență a RFLP.

Enzima	Situs recunoscut	Număr mediu de RFLP detectat cu 100 de sonde
Msp I	C↓C*GG	43
Taq I	T↓C*A	30
Bgl II	A↓GATCT	10
Eco RI	G↓AATTC	9
*Hin*d III	A↓AGCTT	8,5
Pst I	CTGCA↓G	5,7
Rsa I	GT↓AC	4,4
Hinc II	GTPy↓PuAC	2,2
Bam HI	G↓GATCC	1,7

Detecția existenței RFLP se poate face direct (prin analiza la transiluminator a fragmentelor de digestie enzimatică separate electroforetic în gel de agaroză și colorate cu bromură de etidiu, cu constatarea prezenței sau absenței unor benzi), dar pentru decelarea RFLP se poate folosi și Southern-blot. În acest scop, fragmentele separate electroforetic se transferă pe membrană și se procedează la hibridizare cu o sondă specifică. Aceasta poate fi pentru o genă anume sau pentru o genă relativ apropiată de gena în discuție. Sonda va recunoaște o secvență bine stabilită. Dacă există alele diferite pentru gena în discuție, sonda poate detecta polimorfismul. Deseori este necesar să se folosească o varietate de enzime de restricție pentru a detecta diferitele alele.

Tipul de sondă utilizat impune anumite condiții proprii:

- un ADNc nu poate pune în evidență decît RFLP exonice sau juxta-exonice;
- o sondă obținută din ADN genomic, corespunzând unei gene sau unui fragment de genă, pune în evidență RFLP exonice și intronice;
- o sondă de ADN genomic anonim pune în evidență RFLP extragenice.

De fiecare dată când este clonată o nouă sondă intra- sau extragenică, ea este utilizată și pentru studii de RFLP. Studiul este aleatoriu și constă în testarea unui număr mare de enzime de restricție pe eșantioane de ADN genomic. Utilizând o sondă cu un număr mare de nucleotide și enzime cu numeroase situsuri de restricție (formate din 4 nucleotide), se amplifică numărul de zone explorate de sondă, deci și șansa de a se găsi un anumit RFLP.

Pentru a înțelege de ce trebuie testată o varietate de enzime de restricție pentru a detecta diferitele alele, este necesar să se cunoască cele trei tipuri de mutații ADN care pot avea loc pentru a genera alele.

Tipuri de mutații. Se cunosc:

- *mutații punctiforme,* care implică o singură bază din ADN. Mutațiile apar atunci cînd secvența de recunoaștere pentru o enzimă de restricție este alterată, astfel încît enzima nu mai recunoaște situsul și nu îl hidrolizează. De exemplu, secvența G↓AATTC este recunoscută de enzima *Eco* RI; dacă ea este alterată (GA**G**TTC), enzima nu-și mai manifestă acțiunea. O mutație care afectează situsul pentru o enzimă nu va fi recunoscută de o altă enzimă de restricție (de exemplu, *Hin*d III care recunoaște secvența A↓AGCTT nu va detecta un RFLP generat de o mutație punctiformă în situsul de recunoaștere *Eco* RI);

- *inserțiile ADN* pot avea loc în cromozom. Acestea pot fi de mici (o bază) sau de mari (multe kb) dimensiuni. În unele cazuri, întreaga genă poate fi amplificată pe cromozom. Dacă inserția este destul de mare și este conținută în interiorul unui fragment de restricție care poate fi detectat de sonda de hibridizare, atunci un fragment de restricție mai mare poate fi detectat prin Southern blot;

- *delețiile din ADN*, într-o situație analogă inserției, pot fi mari sau mici. Uneori întreaga genă este deletată de pe cromozom. Dacă deleția este destul de mare și este conținută într-un fragment de restricție care poate fi detectat de sonda de hibridizare, atunci un fragment de restricție mai mic poate fi detectat prin Southern blot. Acest RFLP reprezintă alelele conținând deleția.

Variațiile în RFLP pot fi utilizate pentru stabilirea unor relații intra- sau interspecii. RFLP evidențiază o serie de modificări genetice (substituție, inserție sau deleție de baze), dar această analiză este limitată la zone cu număr mic de copii, cu dimensiuni reduse de secvență.

Tipuri de RFLP. Pentru a putea fi utilizat ca marker genetic, RFLP trebuie să corespundă unei zone bine individualizate din genom și să aibă caracter informațional.

În principiu, prima condiție impune ca sonda utilizată să recunoască numai o secvență unică din genom. Numai în aceste condiții, polimorfismul de restricție caracterizează un locus. În general, cercetarea de tip RFLP a ADN repetitiv este foarte delicată, minisateliții putând fi „unelte“ importante de studiu.

A doua condiție constă în caracterul informațional, definit prin probabilitatea unui individ de a fi heterozigot pentru un locus considerat, adică să prezinte două alele diferite. Această probabilitate depinde de frecvența alelelor în populație.

Se disting RFLP bi- (sau paucialelice) și multialelice.

Cele mai frecvente *RFLP bialelice* corespund adesea unor polimorfisme prin mutații punctiforme, care crează sau înlătură un singur situs de restricție, generând doar două versiuni posibile pentru un cuplu sondă/enzimă de restricție. Studiul individual al RFLP presupune determinarea frecvenței sale alelice în populație, permițând să se calculeze frecvența teoretică a hetero- și homozigoților.

Uneori, aceeași sondă poate detecta mai multe RFLP cu enzime de restricție diferite. În acest caz, fiecare cuplu sondă/enzimă definește un sistem alelic diferit. Localizarea în același cromozom a două variante nonalelice definește un haplotip.

RFLP multialelice sunt polimorfisme de rearanjare sau de repetiție. Este vorba adesea de o secvență repetată în tandem la același situs. Numărul de repetiții variază de la un individ la altul și constituie o alelă. Juxtapunerea secvențelor repetate favorizează *crossing-over* inegale, conducând la creșterea sau la reducerea numărului de copii. Regiunile implicate sunt numite minisateliți sau VNTR (*variable number of tandem repeats*), deoarece ele prezintă pe o distanță relativ scurtă (câteva kb sau zeci de kb) o organizare de ADN satelit (aglomerare de secvențe repetate în tandem). Prin marea lor capacitate informațională, ele reprezintă markeri genotipici prețioși. Numărul de minisateliți cunoscut este încă restrîns. Primii descoperiți par a avea o localizare cromozomală unică. Acesta este și cazul minisateliților descoperiți în apropierea genelor pentru α-globină, insulină, *Ha*-ras 1 (tabel 4).

Tabelul 4 — Principalele polimorfisme de restricție multialelice (VNTR)

Sondă	Locus	Cromozom	Nr. de alele cunoscut	Capacitate informațională	Observații
pAW101	D14S1	14q34	>15	0,85	primul RFLP anonim descoperit
pH I	INS	11p15	≥11	0,78	RFLP în 5' al genei insulinei
pTBB-2	HRAS1	11p15	ridicat	0,47	RFLP în 5' al onco- genei C-*Ha*-ras1
HVR-3'	HBA	16p12	ridicat	0,95	RFLP la 8kb în 3' al genei α1–globinei
29CI	DXYS12	Xp22 și Yp	>20		regiunea pseudo-autozomală a cromozomilor X,Y
minisateliți foarte dispersați		numeroși autozomi	>100	1,00	RFLP repetitiv dispersat pe toți autozomii

Minisateliții diseminați — markeri genotipici importanți. Minisateliții hipervariabili corespund unor regiuni dispersate în mulți cromozomi și pot fi explorați simultan cu aceeași sondă. Ei sunt secvențe particulare, fiind repetitivi, dispersați și având un grad ridicat de polimorfism. Minisateliții permit stabilirea specificității genetice a unui individ sau a unei linii celulare. Ei constituie markeri genetici utilizați pentru cartografiere, permițând studierea segregării a numeroși loci. Utilizarea de sonde minisatelit multi-locus este dificilă, deoarece în imaginile complexe obținute este practic imposibil de recunoscut perechile alelice. Pentru a realiza acest lucru este necesară subclonarea secvențelor unice prezente în vecinătatea sau în interiorul repetițiilor, pentru a obține sonde monospecifice unui locus dat. Prin intermediul condițiilor de hibridizare particulare, aceste sonde recunosc loci specifici hipervariabili.

Numărul exact și relațiile între diferitele familii de secvențe minisatelit nu este încă suficient cunoscut. În unele cazuri, există o omologie de secvențe în numeroase familii, spre exemplu pentru secvențele hipervariabile (*HVR*) învecinate genelor α-globinei din cromozomul 16 și ale insulinei din cromozomul 11.

Stategii de cercetare a RFLP. S-ar putea interpreta că RFLP sunt distribuite în mod aleator în genom. Însă, experiența a arătat că nu întotdeauna este cazul (frecvența RFLP din cromozomul X este de trei ori mai mare decât aceea a RFLP din cromozomii autozomi).

RFLP-uri genice (intra- sau juxtagenice) sunt legate de gene implicate în patologia ereditară: genele globinei (hemoglobinopatii); gena factorului VIII (hemofilia

A); gena DMD (miopatia Duchenne). Cercetările sunt dificile atunci când dimensiunile teritoriului de explorat sunt mari și când exonii sunt foarte mici și foarte dispersați, cum se întâmplă pentru genele factorului VIII și ale DMD. În aceste cazuri explorarea este efectuată cu sonde de ADNc care analizează RFLP exonice și juxtaexonice. Pentru aceste gene, stabilirea secvenței exonilor este prioritară în raport cu cea a intronilor. De aceea, cunoștințele despre RFLP intronice sunt mai puțin avansate.

RFLP-uri anonime sunt detectate cu sonde anonime, provenite dintr-o bancă de ADN genomic.

RFLP-urile sunt utilizate pentru:

- stabilirea hărții genetice (umane);
- diagnosticul maladiilor genetice monofactoriale;
- cercetarea maladiilor poligenice;
- analiza nondisjuncțiilor cromozomale (aneuploidii);
- identificarea indivizilor (organisme și celule);
- controlul reușitei grefelor.

Variante ale RFLP. Tehnica RAPD *(polimorfismul amplificării aleatorii a ADN)*, este o alternativă mai rapidă a RFLP, utilizată pentru cartare și se bazează pe o amplificare enzimatică diferențială a unor mici fragmente de ADN prin PCR, cu primeri decamerici aleatori. Primerii trebuie să aibe mai mult de 50% **GC** și să prezinte **G** și **C**, la capătul 3'.

Polimorfismul rezultă prin alterarea legării primerilor la zonele corespunzătoare în urma inserțiilor, delețiilor sau mutațiilor punctiforme. Tehnica prevede doar folosirea electroforezei, cu evidențierea prezenței sau absenței anumitor benzi specifice.

În tabelul 5 este prezentată o comparație între caracteristicile RFLP și RAPD.

Tabelul 5 — Comparație între caracteristicile tehnicilor RFLP și RAPD

RFLP	RAPD
ADN pur, pentru restricție	orice tip de preparate ADN
cantitatea de ADN (μg)	cantitatea de ADN (ng)
de obicei necesită sonde marcate	vizualizare directă pe gel
timp lung de procesare	rezultate într-o zi
blottingul complică automatizarea	automatizare ușoară a tuturor etapelor
reproducerea rezultatelor depinde de posibilitatea de clonare a fragmentelor de ADN	rezultate ușor de comparat; este suficientă cunoașterea secvenței primerilor și a alternanței temperaturilor de lucru
depinde de caracteristicile markerului codominant	depinde de caracteristicile markerului dominant

4.4. FOOTPRINTING

Footprinting este o metodă de identificare a regiunilor din molecula ADN care sunt implicate în legarea de proteine, specifice sau nu. Se realizează prin digestia endonucleazică nespecifică a ADN liber, necomplexat, în comparație cu ADN complexat, urmărirea efectuându-se electroforetic și prin determinarea secvenței. Fragmentul de ADN luat în studiu este marcat la capătul 5' cu ^{32}P, așa cum se procedează în cadrul metodei Maxam-Gilbert de determinare a structurii primare. În continuare, alicote de probă — interacționată sau nu cu o anumită proteină — sunt digerate cu concentrații atât de scăzute de DNază I încât fiecare fragment de ADN este tăiat o singură dată. În absența proteinei, proba va fi scindată într-o multitudine de mici fragmente, pe cînd în prezența proteinei, anumite secvențe din ADN vor fi protejate. După terminarea hidrolizei se face deproteinizarea probelor, denaturarea lor și se trece la separarea electroforetică. Apoi, prin autoradiografie, se detectează catenele radiomarcate și se evidențiază toate fragmentele, de la capătul marcat spre situsul de clivare cu DNază I. Eventual, pe același gel, se face inclusiv secvențializarea, dacă se execută reacțiile corespunzătoare pentru G, A+G, C+T, C (fig. 8).

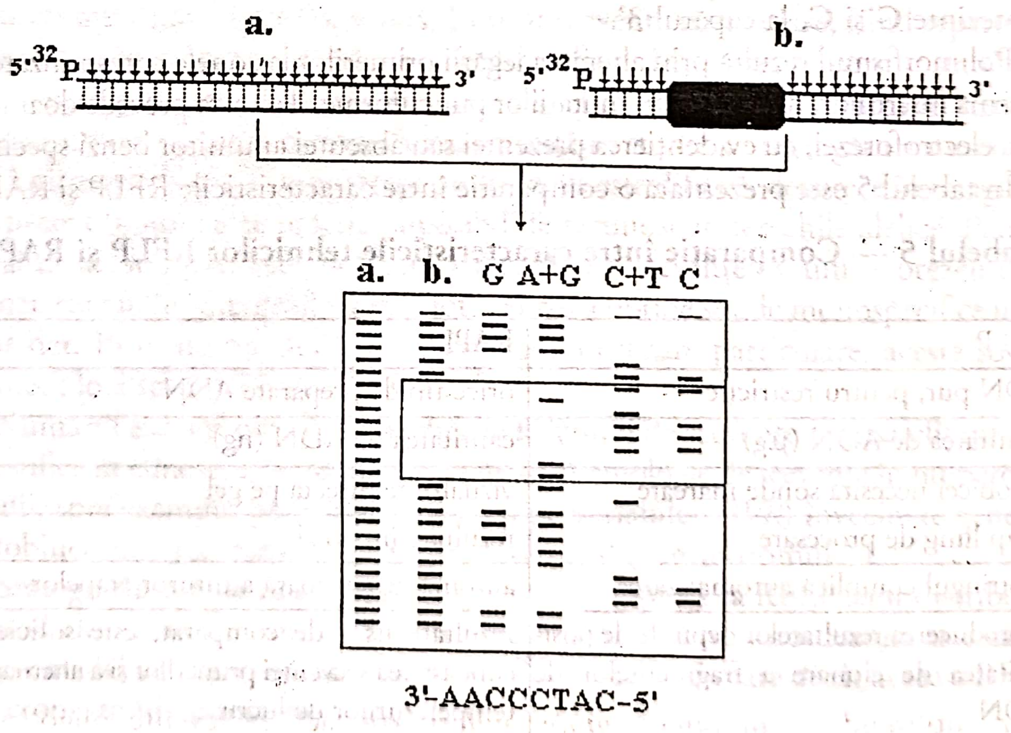


Fig. 8 — Schema analizei footprinting.

La determinarea structurii primare vor fi lipsă exact acele benzi de nucleotide care corespund secvenței „acoperite“ de proteină, putându-se astfel citi compoziția acesteia. Această „acoperire“ reprezintă „urma“ acelei secvențe, adică *footprinting*-ul său.

5. HIBRIDIZAREA ACIZILOR NUCLEICI

Sunt aproape 50 de ani de când Watson și Crick (1953) au descris structura ADN și rolul acestei molecule în conservarea și transmiterea informației genetice. Astăzi este un lucru de la sine înțeles că în majoritatea lor speciile moleculare de ADN au o constituție bicatenară, în care cele două lanțuri polinucleotidice sunt complementare din punct de vedere al compoziției în baze și sunt stabilizate prin punți de hidrogen. De asemenea, există și molecule de ARN bicatenar.

Între proprietățile acestor molecule bicatenare se numără și comportarea la temperaturi ridicate sau în prezența unor agenți care conduc la disocierea celor două catene, anularea acestor factori denaturanți, permițând reasocierea, reordonarea, renaturarea dublului helix. Când lanțurile monocatenare aparțin unor molecule diferite, procesul de refacere a structurii dublu catenare poartă numele de ***hibridizare.*** Cu alte cuvinte, pot apare molecule bicatenare tip ADN:ADN, ADN:ARN, ARN:ARN.

Stabilitatea moleculelor respective este caracterizată de temperatura de topire, adică acea valoare a temperaturii la care structura secundară bicatenară este „desfăcută“ 50% (aprecierea se face spectrofotometric). T_m este determinat de compoziția în baze azotate (G+C %), dar și de factori externi, cum ar fi tăria ionică, lungimea catenei, concentrația agenților denaturanți. Valoarea T_m este importantă, deoarece precizează de la ce temperatură în jos se pot forma hibrizi.

O perfectă împerechere a secvențelor nucleotidice complementare duce la formarea unui ADN foarte stabil. Același principiu se aplică și moleculelor de ARN, ca și hibrizilor ADN:ARN.

Reacția de hibridizare a acizilor nucleici are o mare specificitate, baza fiind complementaritatea nucleotidelor implicate în structura primară, ceea ce face ca această metodă să aibă aplicații practice de mare importanță. Ținând cont că probabilitatea de a întâlni doar întâmplător o anumită secvență este foarte mică, prezintă interes identificarea și localizarea unor gene întregi. Acest lucru se poate realiza utilizând așa-numitele ***sonde moleculare,*** adică secvențe oligo- sau polinucleotidice, cu structură primară cunoscută și complementară zonelor de studiat, numite ***țintă.***

5.1. CARACTERISTICILE SONDEI MOLECULARE

Gradul de omologie între sonda moleculară și țintă determină stabilitatea hibridului format. Pentru a putea fi folosită ca sondă, o secvență de nucleotide trebuie să fie cunoscută, izolată, produsă în cantitate suficientă și marcată așa încât să fie decelabilă la un prag cât mai scăzut (limită de detectabilitate). Sonda ideală este un acid nucleic monocatenar, indiferent de tip (ADN sau ARN), care poate hibridiza integral cu țintă. Deoarece este greu de lucrat cu molecule prea mari, în practică sondele se obțin fie prin sinteză chimică sau enzimatică (PCR), fie — cel mai frecvent — prin izolarea și purificarea secvențelor nucleotidice de interes după digestia acidului nucleic cu endonucleaze de restricție.

O problemă de interes major în hibridizare este cea a specificității sondei, în strînsă legătură cu structura sa primară și cu condițiile de utilizare. Din acest punct de vedere, se impun unele restricții, cum ar fi cele de hibridizare specifică cu acidul nucleic țintă, care trebuie să fie unic și, foarte important, să nu reacționeze cu ea însăși.

5.1.1.Dimensiunea sondelor moleculare. Un factor important pentru hibridizare îl constituie dimensiunea sondei, care poate fi cuprinsă între 10–10000 nucleotide (masă moleculară 3×10^3- 3×10^6 Da). Cel mai adesea se folosesc sonde de 15–100 baze. Din datele statistice s-a calculat că pentru eliminarea sau diminuarea accentuată a șansei de hibridizare prin hazard, dimensiunea minimă a unei sonde trebuie să fie de 20 nucleotide. Exceptând unele sonde la care există „extrabaze" pentru marcare, întreaga lungime a acestora trebuie să fie complementară secvenței ce urmează a fi identificată. Deși sondele moleculare de dimensiuni mici hibridizează rapid, ele prezintă unele dezavantaje cum ar fi: determinarea unui număr relativ mare de reacții nespecifice; la testarea unor subtipuri sau variante pot conduce la reacții de *cross-reactivitate*; fiind prea scurte ridică probleme de eficiență a marcării etc.

5.2.MARCAREA SONDELOR MOLECULARE

Pentru a putea fi utile, sondele moleculare trebuie să fie decelabile după hibridizarea cu ținta. În acest scop, ele trebuie să fie marcate astfel încât să dea un semnal atît calitativ, cît și cantitativ. Marcajul poate fi atașat sondei sau încorporat în aceasta. Izotopii radioactivi cum ar fi ^{32}P, ^{35}S, ^{125}I, ^{3}H sunt încorporați în structura moleculei și generează „sondele calde". Tehnicile chimice deja uzuale pentru sinteza NTP sau dNTP cu ^{32}P-α– sau ^{32}P-γ-ATP au permis comercializarea acestor compuși, încă de acum 20 de ani.

O baterie completă de enzime — ADN polimeraze (de *E. coli* sau *Thermus aquaticus*), ARN polimeraze, reverstranscriptază, deoxinucleotidiltransferaze, polinucleotidilkinază etc. — a permis încorporarea acestor unități în acizii nucleici sondă. Obținerea în laborator a fragmentului Klenow din ADN polimeraza I de *E. coli* și a polimerazei fagului T7 a ușurat realizarea sondelor marcate cu ^{32}P.

În afara acestor avantaje, sondele radioactive prezintă și inconveniente, legate de timpul de înjumătățire scurt (de exemplu 14 zile pentru ^{32}P sau 87 zile pentru ^{35}S) sau prea lung (12,6 ani pentru ^{3}H), precauțiile speciale de manipulare și — nu în ultimul rând — imposibilitatea de a localiza uneori ținta cu precizie, la nivel celular (la hibridizările *in situ*) din cauza radiației de înaltă energie care afectează fondul.

Pornind de la aceste considerente, trebuie spus că în acest moment sunt preferate sondele marcate cu compuși neradioactivi ("sonde reci"). S-au pus la punct diverse sisteme de marcare a sondelor reci, pe baza proprietăților bazelor azotate din structura polinucleotidului utilizat. Tabelul 6 prezintă o selecție a acestor posibilități.

Tabelul 6 — Tipuri de markeri neradioactivi și situsurile de marcare

Situs de marcare	Modalitate de marcare	Markeri neradioactivi
baza azotată	modificare chimică la situsuri bine determinate modificare chimică la situsuri nedeterminate incorporare enzimatică a nucleotidelor marcate (*nick-translation, random primed)*	- acetilaminofluorenă - biotinilhidrazină - bisulfit de sodiu - dinitrofenol - fotobiotină - dinitrofenol - biotină - digoxigenină - fluoresceină - bromdeoxiuridină etc.
capătul 3'	oxidarea grupărilor -OH vicinale	- tiosemicarbazide fluorescente
capătul 5'	activarea cu carbodiimide solubile, care permite cuplarea grupărilor $-NH_2$ aparținând altor molecule	- N-hidroxisuccinimid esteri ai biotinei
scheletul fosfat	1. cuplarea chimică a unor molecule pozitive 2. interacția ionică cu restul fosfat	
marcarea enzimatică a oligonucleotidelor	cu deoxinucleotidiltranferază 3'-terminală	- biotină - digoxigenină - fluoresceină - bromdeoxiuridină - dinitrofenol

5.2.1. Strategii de marcare. S-au imaginat diferite sisteme:

Marcarea directă — enzimele cu care se face în final detecția hibridului, mai ales fosfataza alcalină și peroxidaza, sunt adesea legate covalent de sondă prin intermediul unui *spacer* (înlănțuire de atomi care pe de o parte permite hibridizarea fără existența unor impedimente sterice, iar pe de altă parte nu modifică activitatea enzimatică)

Încorporarea enzimatică — metodele adoptate pentru încorporarea nucleotidelor deja marcate (cu biotină, digoxigenină, fluoresceină) sunt *nick-translation*, sinteza sau extensia *random primed* sau *end-labelling* (marcarea la capăt). În acest caz se utilizează nucleotide deja modificate, cum ar fi (fig. 9):

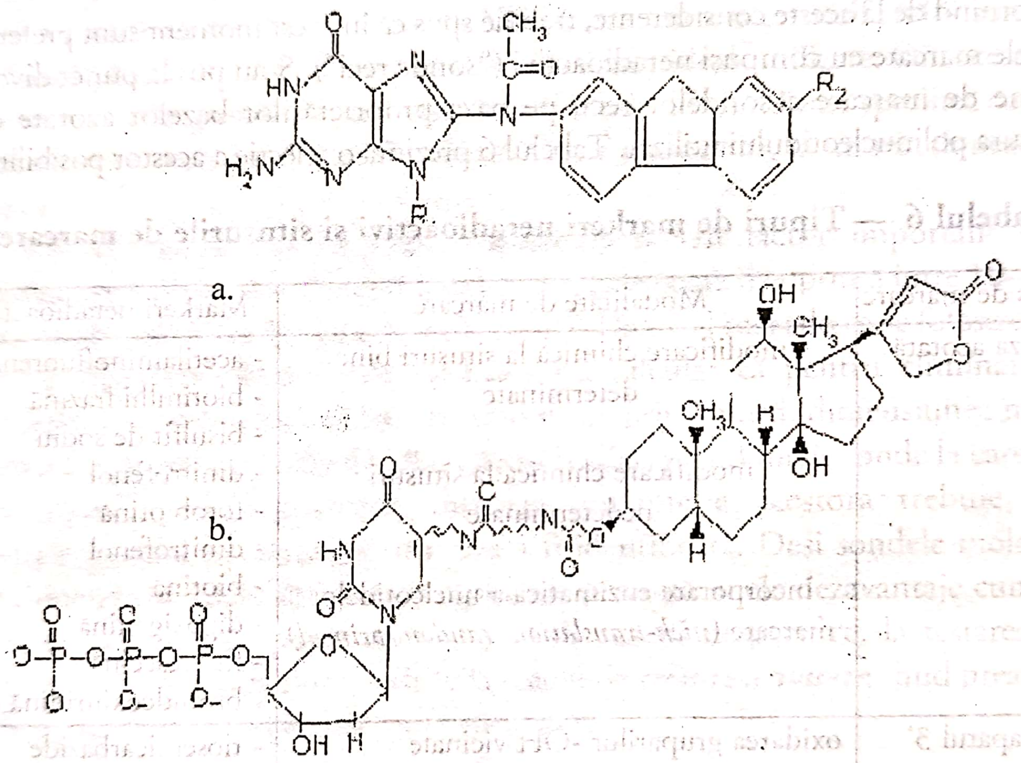


Fig. 9 — Nucleotide modificate: a. dUTP-digoxigenină;
b. guanozil-acetilaminofluorenă.

Pentru reducerea impedimentelor sterice și a instabilității termice a duplexurilor de acizi nucleici, precum și pentru mai buna expunere a biotinei la acțiunea moleculelor de vizualizare (legate de avidină sau streptavidină) s-a propus biotinilarea cu dNTP cu ajutorul esterului N-hidroxisuccinimidei biotinilate, prevăzut cu un *spacer.* În mod analog, digoxigenina — din familia glicozidelor cardiotonice — se leagă la dNTP prin intermediul unui *spacer* alilaminic.

Introducerea de haptene. Aceste metode depind de modificarea chimică a ADN sau ARN, prin care bazele purinice și pirimidinice devin antigen-specifice. Pentru aceasta, se apelează la legarea unor grupări sulfonice sau la transaminare.

Fotomarcarea ADN și ARN — se poate face cu fotobiotină, care generează arilnitrene, ce se pot cupla cu bazele azotate ale acizilor nucleici.

Marcarea în cursul sintezei — realizabilă cu ajutorul PCR, permite marcarea sondei prin incorporarea dNTP marcați pe parcursul etapei de extensie. Sondele ARN se pot marca eficient *in vitro* prin înglobarea nucleotidelor marcate sub acțiunea ARN polimerazelor din fagii SP6, T3 sau T7.

Marcarea cu chelați fluorescenți ai lantanidelor — prezintă avantaje față de marcarea cu substanțe fluorescente convenționale, deoarece timpul de viață al fluoroforilor convenționali este a 100 nsec, pe când cel al compușilor europiului sau ai altor lantanide este cuprins în domeniul 100–1000 nsec. Acești derivați au și avantajul scăderii fondului (*background*) generat de interferența fluorescenței materialelor naturale în probă.

End-labelling enzimatic — se aplică oligonucleotidelor sintetice și se realizează fie la capătul 3' cu deoxinucleotidiltransferază terminală, fie la capătul 5' cu T4–poli-nucleotidkinază. În ambele cazuri, marcarea se poate face cu rezultate bune folosind digoxigenină sau derivați de biotină.

Acidul nucleic-țintă — sondele moleculare pot fi astfel construite încît să deceleze genuri, specii sau tulpini (de bacterii sau, mai ales, de virusuri). Ele pot decela gene conservate (prezente în cîteva genuri diferite) sau o parte a acestora.

4.2.2.Strategii de hibridizare. Utilizarea sondelor moleculare se poate face în cadrul a diverse tehnici, cum ar fi cele care implică folosirea fazei solide sau a celei lichide.

Tehnici în fază solidă — tehnica este denumită în mod uzual *filter hybridization*. Este considerată cea mai veche metodă utilizată în laborator, deși poate prezenta dezavantaje legate de unele interferențe nespecifice, care determină creșterea fondului (*background*). Suportul de realizare a reacției de hibridizare îl constituie membranele de nitroceluloză, nylon, polivinilidenfluorură, hârtie Whatmann 541, bile de Sephacryl S-500, particule de latex, plăci de polistiren sau difluorură de polivinil, membrane mixte tip BAS etc.

Tehnica de bază constă în adsorbția nespecifică a acidului nucleic-țintă monocatenar la faza solidă, cu fixare termică (80^0-100^0C, în funcție de tipul de suport) sau sub radiație UV și cu vizualizarea semnalului direct pe suport.

În practică, hibridizarea în fază solidă a primit denumiri deja consacrate:

- ***dot-blot hibridizarea*** — cu fixarea acidului nucleic monocatenar țintă pe suportul solid;

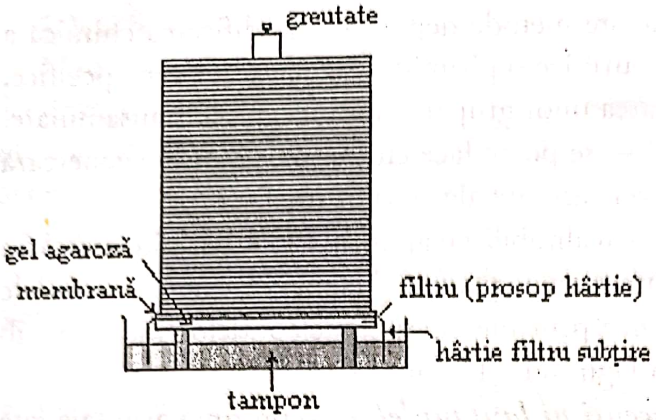


Fig. 10 — Blotting pe membrană.

- ***Southern-blot hibridizarea*** — presupune transferul ADN-țintă tratat cu enzime de restricție și denaturat, de pe gelul de agaroză (sau poliacrilamidă) pe un suport solid (membrană). Transferul se face prin presare-stoarcere (fig. 10), cu ajutorul vidului sau prin electroblotting.

Sonda moleculară hibridizează numai cu fragmentul de ADN-țintă cu care este complementară (fig. 11).

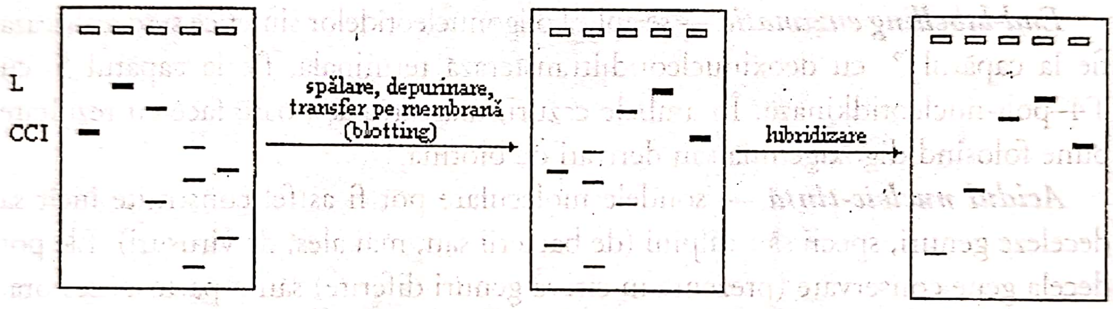


Fig. 11 — Schema hibridizării Southern-blot.

O variantă a acestei tehnici este *revers-blot*, în care sonda moleculară este supusă electroforezei și transferată, iar hibridizarea se face cu ADN-țintă marcat;

- ***Northern-blot*** — se deosebește de cea anterioară doar prin aceea că ținta o constituie ARN (genomic, mesager sau ribozomal).

Southern-blot și cu atât mai mult Northern-blot sunt tehnici relativ laborioase, care sunt aplicate deocamdată numai în cercetările fundamentale;

- ***hibridizarea in situ*** — se aplică celulelor ca atare, fixate sau înghețate, amprentelor celulare și culturilor de celule. Metoda este adecvată în histopatologie, pentru determinarea unor celule infectate sau având alte caracteristici sau pentru localizarea anumitor secvențe polinucleotidice. A fost utilizată și pentru analiza posibilei implicări a unor virusuri în procesele de malignizare;

- ***hibridizarea coloniilor** (colony hybridization)* — permite analiza simultană a acizilor nucleici din multiple colonii bacteriene (celulare), după transferul acestora de pe suportul de creștere pe membrana de hibridizare. Metoda evidențiază prezența unor clone celulare recombinate;

- ***sandwich-hibridizarea*** — s-a impus ca o nouă tehnică, în scopul evitării unor interferențe nespecifice care pot apare pe parcursul tehnicilor deja menționate. Implică un sistem compus din trei elemente: sonda de captură, legată de faza solidă, acidul nucleic-țintă și sonda marcată, care dă semnalul.

Ulterior, această tehnică a fost îmbunătățită prin metoda înlocuirii catenei (fig. 12).

În acest sistem, sonda-semnal este atașată la sonda de captură. Prin competiție, ținta înlocuiește sonda monocatenară marcată, astfel încât testul este pozitiv în absența semnalului. Deoarece metoda este greoaie, are o slabă aplicabilitate. Dacă pentru captură este utilizat direct acidul nucleic-țintă, apar unele avantaje, între care stingerea fondului.

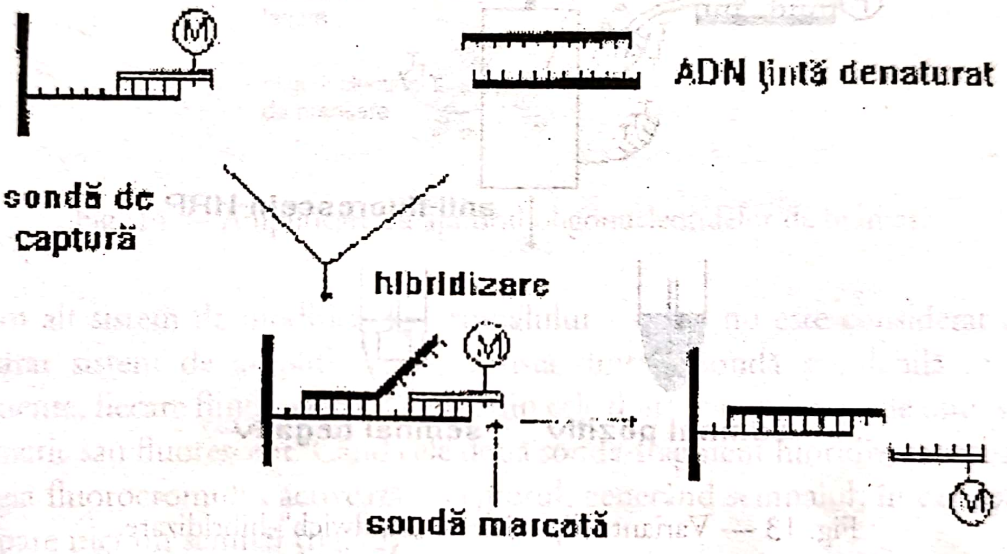


Fig. 12 — Hibridizare prin înlocuirea catenei.

Cea mai recentă îmbunătățire a sandwich-hibridizării o constituie varianta „instant" *dip-stick*. În acest caz, sonda de captură are o „coadă" oligonucleotidică formată dintr-un singur tip de nucleotide, iar pe suportul solid se află complementul său. Sonda de captură hibridizează cu ținta din proba de analizat, iar decelarea se va face cu o a doua sondă, marcată cu un ligand decelabil. În acest sens există truse comerciale în care sonda este marcată cu fluoresceină, iar detecția se face colorimetric, cu peroxidază conjugată cu anticorpi antifluoresceină, în prezența substratului convenabil (fig. 13).

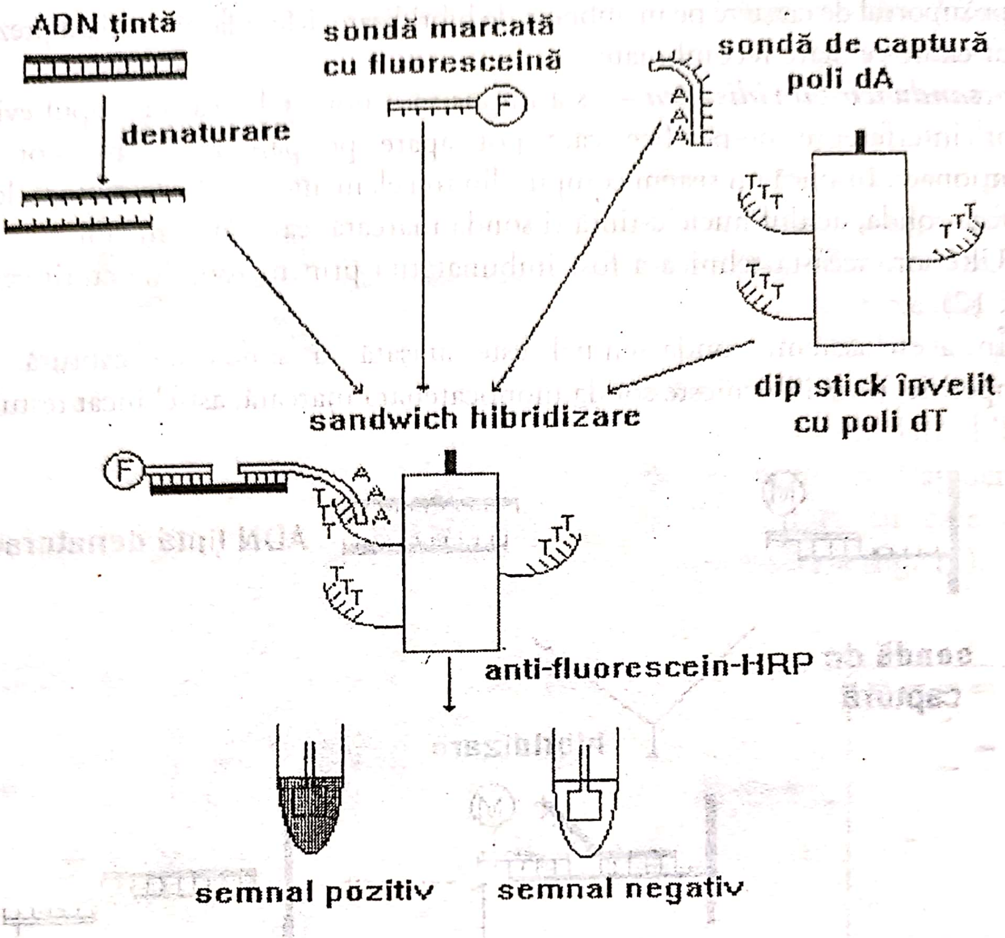

ADN țintă
denaturare
sondă marcată cu fluoresceină
F
sondă de captură poli dA
A A A
T T T
dip stick învelit cu poli dT
sandwich hibridizare
anti-fluorescein-HRP
semnal pozitiv
semnal negativ

Fig. 13 — Varianta dip-stick de „sandwich"-hibridizare.

Tehnici în soluție. Se pot desfășura fie în sistem omogen (foarte rapid, simplu, dar cu sensibilitate scăzută), fie în sistem heterogen (care rezolvă problema separării duplexurilor formate în soluție). Acest tip de hibridizare este de 5–10 ori mai rapid decât hibridizarea pe suport solid, viteza de reacție putând fi mărită cu ajutorul unor acceleratori, dar necesită mai multe etape de lucru anterior decelării hibrizilor formați. Pentru separarea hibrizilor se poate utiliza hidroxiapatita, care are proprietatea de a fixa — printr-un mecanism încă neelucidat — numai moleculele bicatenare, permițând eluția moleculelor monocatenare. Pentru decelare a mai fost propus un colorant cuplat la un suport tip Sephadex; acest colorant de tip intercalare captează numai ADN bicatenar, care apoi eluează cu soluții bazice.

O problemă de mare interes este reprezentată de modul în care se vizualizează hibiridizarea, mai ales atunci când semnalul este prea slab. S-a imaginat o ingenioasă metodă de amplificare a semnalului cu ajutorul oligonucleotidelor de branșare. Acestea au o secvență scurtă care hibridizează cu acidul nucleic-țintă și o altă secvență care servește ca situs de hibridizare pentru oligonucleotide marcate enzimatic. Amplificarea se datorează posibilității de a lega 60–300 de molecule de enzimă la fiecare acid nucleic-țintă (fig. 14).

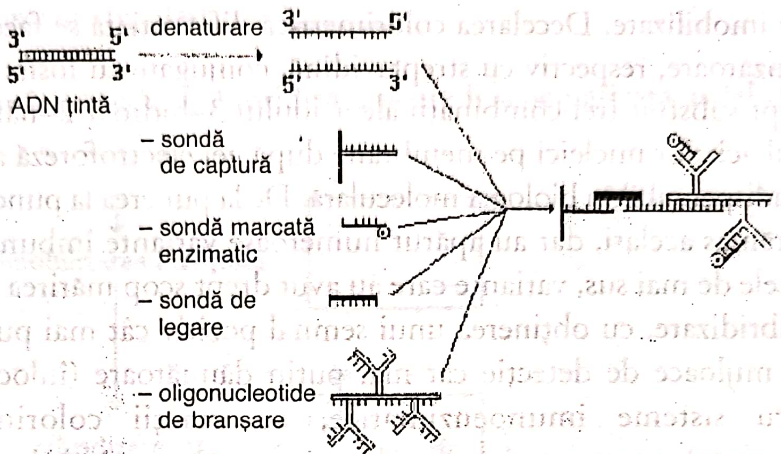

3'
5'
5'
3'
ADN țintă
denaturare
3'
5'
5'
3'
– sondă de captură
– sondă marcată enzimatic
– sondă de legare
– oligonucleotide de branșare

Fig. 14 — Amplificare cu ajutorul oligonucleotidelor de branșare.

Un alt sistem de modificare a semnalului — deși nu este considerat ca un adevărat sistem de amplificare — constă dintr-o sondă scindabilă în două fragmente, fiecare fiind marcat cu unul din cele două componente ale unui sistem enzimatic sau fluorescent. Când cele două sonde-fragment hibridizează adiacent, energia fluorocromului activează acceptorul, generând semnalul, în caz contrar, nu apare nici un semnal (fig.15):

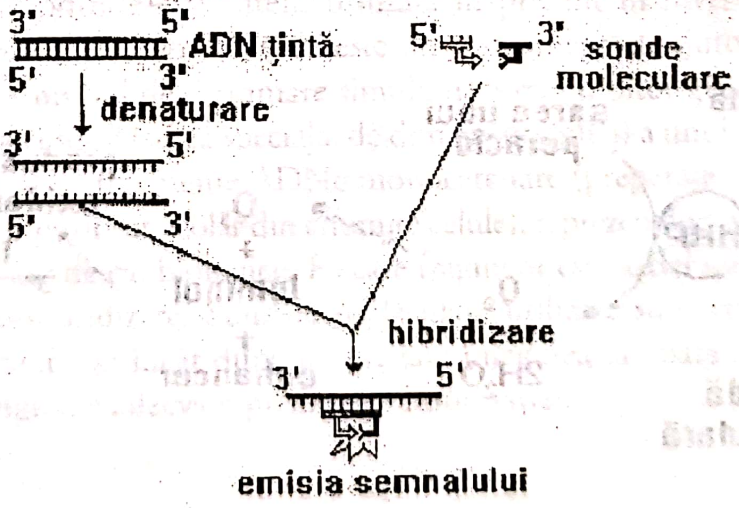

3'
5'
ADN țintă
5'
3'
denaturare
3'
5'
5'
3'
5'
3'
sonde moleculare
hibridizare
3'
5'
emisia semnalului

Fig. 15 — Obținerea semnalului prin cuplarea a două sonde.

Un caz particular de detecție a hibridizării îl constituie sistemul „curcubeu" (*rainbow detection*). Utilizarea sa permite decelarea concomitentă a unor secvențe discrete și distincte de acid nucleic-țintă, cu sonde marcate diferit. Sondele, marcate cu digoxigenină, fluoresceină sau biotină sunt hibridizate simultan — în *cocktail* — cu țintele imobilizate. Decelarea colorimetrică diferențiată se face cu serurile anti corespunzătoare, respectiv cu streptavidină, conjugate cu fosfatază alcalină, utilizând drept substrat trei combinații ale acidului 3–hidroxi-2–naftoic.

Transferul acizilor nucleici pe membrane după gel electroforeză a devenit un instrument indispensabil în biologia moleculară. De la punerea la punct a metodei, principiul a rămas același, dar au apărut numeroase variante îmbunătățite, cum a reieșit din cele de mai sus, variante care au avut drept scop mărirea specificității reacției de hibridizare, cu obținerea unui semnal pozitiv cât mai puțin echivoc, găsirea unor mijloace de detecție cât mai puțin dăunătoare (înlocuirea radioizotopilor cu sisteme imunoenzimatice, cu reacții colorimetrice sau chemiluminiscente), scurtarea timpilor de manoperă pentru obținerea rapidă a răspunsului la hibridizare etc.

Realizarea variantelor clasice de hibridizare utilizate la ora actuală consumă mult timp. Firma Schleicher-Schull a prezentat un kit de marcare neradioactivă și neenzimatică, în care acest interval poate fi scurtat. Sistemul se bazează pe sinteza unui derivat psoralen-biotină, care se poate incorpora cu frecvența de o moleculă reactiv la 20–40 perechi de nucleotide din acidul nucleic. Psoralenii sau furocumarinele sunt cei mai cunoscuți și studiați fotoreactivi ai acizilor nucleici, de care se leagă covalent, preferențial la pirimidine (T, U) și într-o măsură mai mică la C, sub acțiunea UV-A cu $\lambda=365$ nm, datorită existenței a două situsuri reactive din molecula lor. Pentru realizarea hibridizării, proba se iradiază în prezența

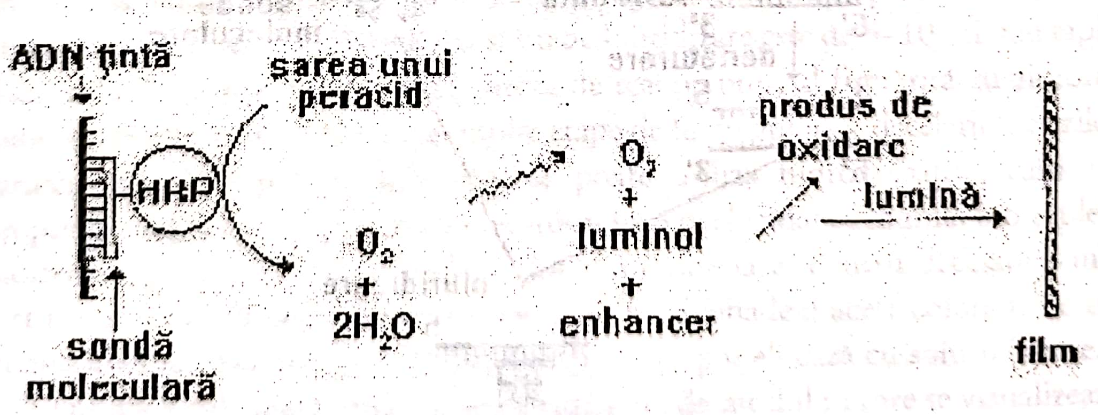


Fig. 16 — Evidențierea semnalului de hibridizare prin chemiluminiscență, cu diverse substraturi (a. și b.)

sondei circa 1 oră, la rece. Reacția fiind pur chimică nu depinde de impurități, de variații mici de temperatură sau *p*H, ci doar de tăria ionică. În continuare, biotina interacționează cu avidin- sau streptavidinfosfataza, iar vizualizarea procesului se face colorimetric (cu substrat pentru suport solid) sau chemiluminiscent (fig. 16).

În concluzie, reacția de hibridizare poate fi schematizată astfel (fig. 17):

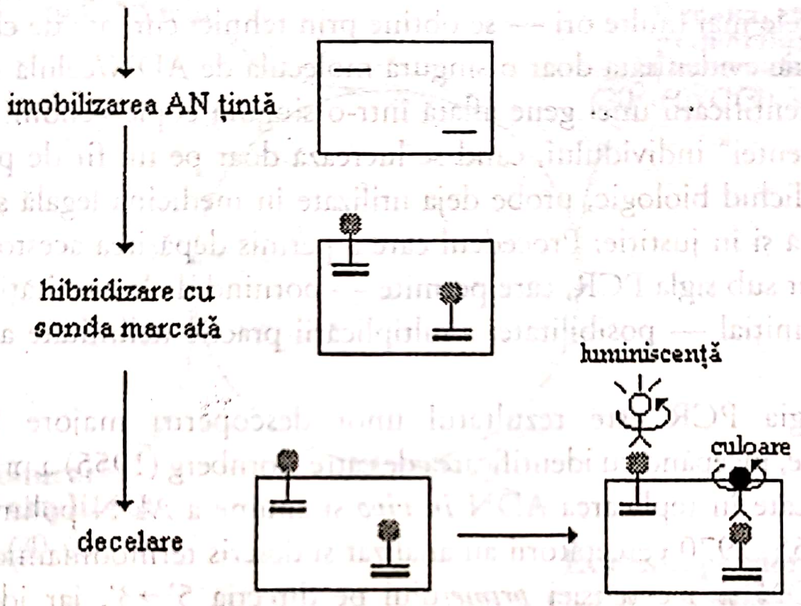


Fig. 17 — Schema generală a reacției de hibridizare.

Reacția de hibridizare este intens utilizată în prezent în investigații de tip *microarray biochip technology*. Metoda este un instrument cu ajutorul căruia se obțin date despre nivelul de exprimare simultană a mai multor gene. Se bazează pe fixarea pe suport solid (sticlă specială, de dimensiuni mici) a unui număr foarte mare (circa 1 000) de fragmente ADNc monocatenare (preparate pornind de la un *pool* de ARNm purificat, izolat din anumite celule), reprezentând gene implicate într-un spectru larg de căi biologice. Fiecare fragment este astfel selectat încât să nu permită *cross*-hibridizare. Sondele moleculare utilizate sunt cel mai adesea marcate fluorescent, așa încât după hibridizare imaginea să poată fi relativ ușor analizată, cu programe adecvate prelucrării informației.

6. REACȚIA DE AMPLIFICARE POLIMERAZICĂ

Reacția de amplificare polimerazică sau reacția polimerazică înlănțuită (*polymerase chain reaction* — *PCR*) este definită ca o metodă de sinteză și amplificare enzimatică *in vitro* a unor secvențe de ADN.

Determinarea secvenței acizilor nucleici sau identificarea unor secvențe nucleotidice din structura acestor macromolecule prin hibridizare reclamă o anumită cantitate de material de analizat, de ordinul ng (10^{-9}g) sau pg (10^{-12}g), care — de cele mai multe ori — se obține prin tehnici curente de clonare. Însă uneori trebuie evidențiată doar o singură moleculă de ADN/celulă sau se pune problema identificării unei gene aflată într-o singură copie/genom. Acesta este cazul „amprentei“ individului, când se lucrează doar pe un fir de păr sau pe o picătură de lichid biologic, probe deja utilizate în medicina legală și admise în criminalistică și în justiție. Procedeul care a permis depășirea acestor dificultăți este cunoscut sub sigla PCR, care permite — pornind de la cantități foarte mici de material inițial — posibilitatea multiplicării practic nelimitate a acestuia *in vitro*.

Tehnologia PCR este rezultatul unor descoperiri majore în științele fundamentale, începând cu identificarea de către Kornberg (1955) a primei enzime direct implicate în replicarea ADN *in vivo* și anume a ADN polimerazei I. În perioada 1955–1970 cercetătorii au analizat și descris termodinamica amorsării replicării ADN și a extensiei *primer*ului pe direcția 5'→3', iar ideea sintezei amplificate a ADN a fost elaborată pentru prima oară teoretic de către grupul lui Khorana. Primele experimente în domeniu au fost realizate de Kleppe și Molineux, aparținând de grupul respectiv, dar ei au realizat doar un număr mic de cicluri de amplificare (2–4) pe un duplex scurt de ADN (20–30 pb), folosind primeri de 9–10 baze.

Procedeul nu a fost extins de colaboratorii lui Khorana din mai multe considerente: scopul științific al celor implicați fusese atins prin evidențierea posibilității sintezei *in vitro* a ADN, ulterior interesul fiind concentrat pe alte domenii; la vremea respectivă nu erau cunoscute ADN polimeraze termostabile, necesare pentru eficientizarea procedeului; dificultatea sintetizării primerilor era în epocă un impediment major.

Metodologia modernă a PCR a fost dezvoltată inițial de către Mullis (1983). În 1985, tehnica a fost prezentată public, iar în 1988 numai subiectul consacrat superconductorilor a fost citat mai des în literatură decît cel legat de PCR.

PCR „exploatează“ anumite etape ale replicării ADN. Se știe că ADN polimeraza utilizează drept matriță (*template*) pentru sinteza unei noi catene complementare un ADN monocatenar. Ținta este flancată de doi primeri, asemănători amorselor necesare replicării ADN *in vivo.* După fiecare ciclu de reacție, numărul copiilor moleculelor inițiale se dublează, astfel încât, la sfârșitul a 30 de cicluri, numărul de molecule amplificate este de $(2^{30}-1)$.

Reacția de amplificare polimerazică constă în repetarea ciclică a unui modul de trei etape (în aceeași ordine pentru fiecare ciclu) (fig. 18):

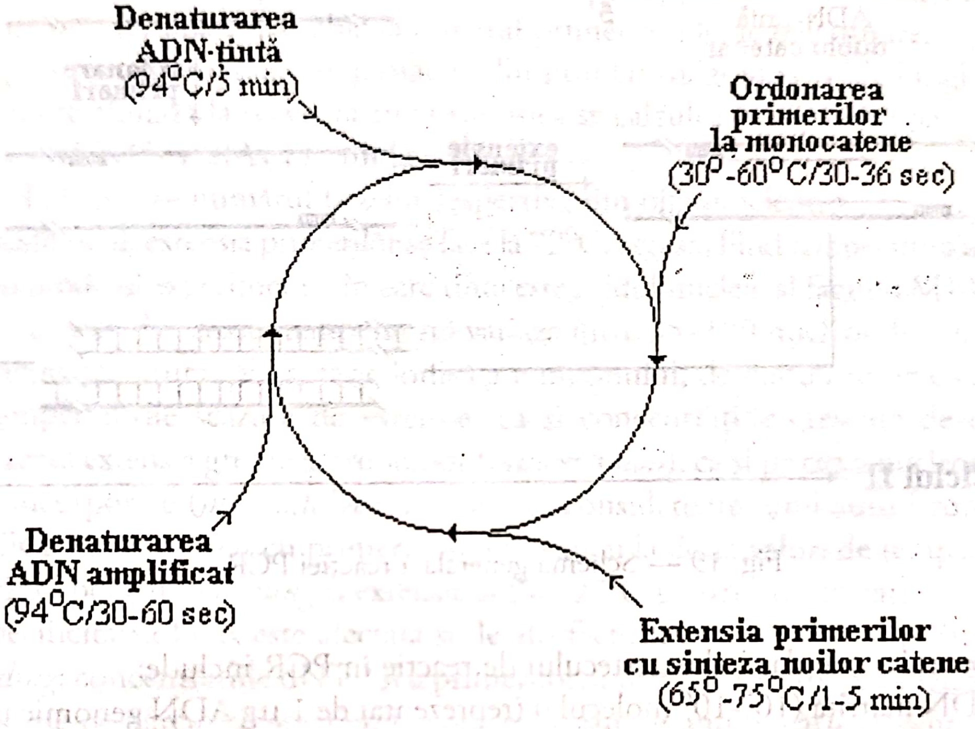

Denaturarea
ADN-țintă
(94°C/5 min)
Ordonarea
primerilor
la monocatene
(30°-60°C/30-36 sec)
Denaturarea
ADN amplificat
(94°C/30-60 sec)
Extensia primerilor
cu sinteza noilor catene
(65°-75°C/1-5 min)

Fig. 18 — Reacția PCR în modul.

- denaturarea ADN matriță
- amorsarea cu primeri care hibridizează cu ADN țintă (*annealing*);
- extensia primerilor sub acțiunea ADN polimerazei.

Singurul parametru variabil pe parcursul ciclurilor este temperatura.

Practic, în primul ciclu de reacție există o moleculă-țintă bicatenară care este denaturată termic, dând naștere la două monocatene; la acestea se ordonează adică se atașează pe baza complementarității de baze azotate (*anneal*) prin hibridizare în zona 3' amorsele (primerii) complementare corespunzătoare. De aici începe extensia prin polimerizare a catenelor complementare-fiice, pe direcția 5'→3'. Produșii de elongare au o lungime determinată de cea a secvenței inițiale flancate de primeri; deoarece ei sunt de asemenea complementari, vor lega aceiași primeri, ciclul de evenimente repetându-se de un anumit număr de ori. Prin PCR se realizează exclusiv amplificarea ADN de interes, cu condiția cunoașterii (măcar parțiale) a secvenței, condiție necesară pentru designul și sinteza unor primeri specifici, discriminatori (fig. 19).

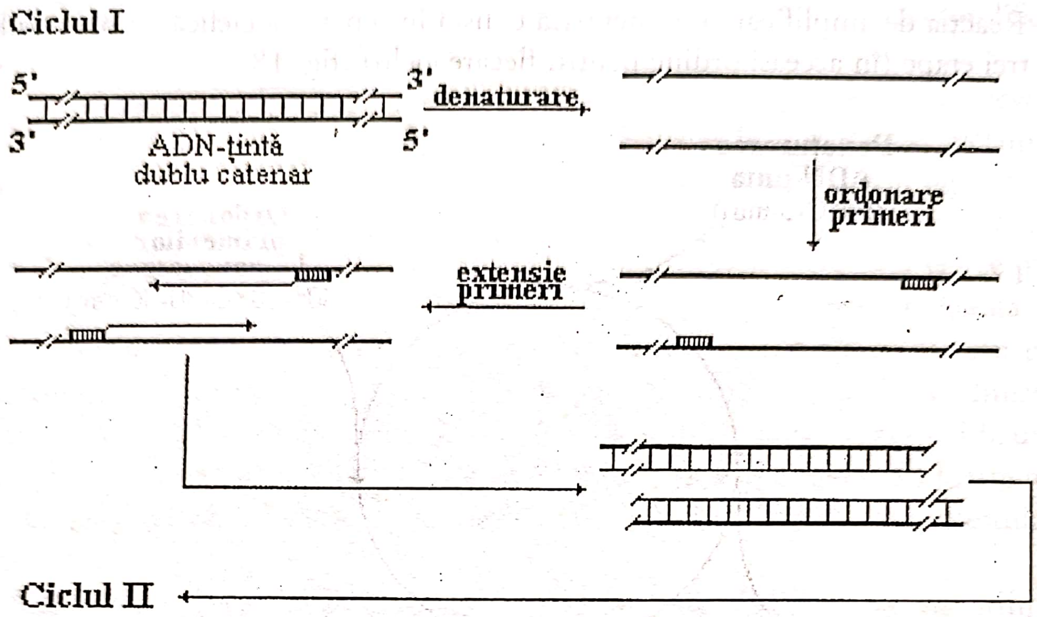


Fig. 19 — Schema generală a reacției PCR.

Protocolul standard al amestecului de reacție în PCR include:

- ADN matriță (10^5-10^6 molecule) (reprezentat de 1 µg ADN genomic uman sau 10 ng ADN de drojdie sau 1 ng ADN cromozomal de *E. coli* sau 1% dintr-o plajă fagică, de exemplu de fag M13);
- gelatină autoclavată sau albumină serică bovină 100 µg/ml, fără nucleaze;
- primeri cu $T_m > 55^0$C, câte 2 µmoli din fiecare;
- dNTP, câte 50 µmoli din fiecare;
- tampon pentru PCR (10x : KCl 500 mM-Tris.HCl 100 mM-$MgCl_2$ 15 mM);
- ADN polimerază termostabilă 2U;
- apă distilată, la un volum final de 50–100 µl.

Așa după cum s-a menționat anterior, parametrul variabil în PCR este temperatura. Condițiile clasice de denaturare sunt de 95^0C/30 sec sau 97^0C/15 sec, dar în cazul țintelor cu conținut ridicat de G+C se recomandă utilizarea unor valori mai mari de temperatură. Denaturarea incompletă reduce cantitatea de produs de amplificare, în timp ce prelungirea acesteia duce la pierderea activității enzimatice.

Temperatura și timpul necesar amorsării depind de compoziția în baze azotate, de lungimea și de concentrația primerilor utilizați. De obicei se folosește o temperatură cu 5^0C mai mică decât T_m corespunzător primerilor, dar cele mai bune rezultate s-au obținut la valori cuprinse în intervalul 55^0-72^0C. Creșterea temperaturii la amorsare mărește gradul de discriminare față de alinierea incorectă a primerilor și reduce extensia greșită a nucleotidelor incorect adăugate la capătul 5'. Se poate spune astfel că temperaturile stringente de *annealing* măresc specificitatea reacției. Există protocoale care, în același scop, recomandă adăugarea *Taq* polimerazei (termostabilă) abia la sfârșitul primei runde de denaturare.

T_d — temperatura la care jumătate din primeri (oligonucleotide lungi de 20 de baze) se aliniază la secvența-țintă specifică se calculează după ecuația:

$T_d = 4(G+C) + 2(A+T)$, unde

A, T, C, G — numărul bazelor respective din oligonucleotid.

Tradițional, extensia primerilor se face la 72^0C, aceasta fiind temperatura optimă pentru modelul experimental în care ținta este acidul nucleic al fagului M13. Rata de incorporare la această temperatură variază între 35–100 nucleotide/sec și este în funcție de natura, *p*H și tăria ionică a tamponului, de natura țintei etc.

Temperaturile scăzute de extensie, ca și concentrațiile crescute de dNTP favorizează extensia greșită a primerilor (*missextension*), ca și pe cea a nucleotidelor greșit încorporate (*missmatched*). Din aceste considerente, unii autori consideră că PCR trebuie realizat cu primeri lungi și numai la două valori de temperatură: 55^0-72^0C pentru *annealing* și extensie și 94^0-97^0C pentru denaturare.

Specificitatea PCR este afectată și de alți factori, în afară de temperatura de *annealing*; concentrațiile dNTP și a primerilor, a Mg^{2+} și a ADN polimerazei pot varia și ele pe parcursul reacției. De obicei, se supun amplificării secvențe ADN cu dimensiuni până la 4 (10) kb.

Așa numitul *long range PCR* permite amplificarea unor acizi nucleici cu dimensiuni mai mari (de 10–20, eventual până la 27 kb). Metoda folosește un amestec de *Taq* pol de înaltă procesivitate (având activitate polimerazică 5'→3') cu o polimerază cu înaltă capacitate de *proofreading* 3'→5' (*Pwo* sau *Tth* pol). Aceste enzime asigură o extensie susținută a primerilor, pe parcursul a circa 40 de cicluri, cu obținere de ampliconi lungi.

6.1. PARAMETRII REACȚIEI DE AMPLIFICARE

6.1.1. Concentrația enzimei și tipul ei. Inițial, s-a folosit ADN polimerază de *E. coli* (fragmentul Klenow), astfel că fiecare rundă necesita o nouă cantitate de enzimă, pentru compensarea celei denaturate termic. Introducerea unor polimeraze termorezistente, izolate din bacterii termofile cum ar fi *Thermus flavus, Thermococcus litoralis, Thermophilus aquaticus, Pyrococcus furiosus* etc., a constituit un prim pas spre automatizarea procesului. La ora actuală, cea mai utilizată polimerază este cea din *Th. aquaticus* (*Taq*), pentru care s-au realizat majoritatea protocoalelor de lucru, dar se preconizează înlocuirea ei cu enzima din *P. furiosus* (*Pfu*) cu o termostabilitate superioară și cu proprietăți de corectare (*proof-reading*) mai bune decît ale altor polimeraze similare. Experimentele au arătat că ADN polimeraza *Pfu* are o fidelitate de 12 ori mai mare decât *Taq* polimeraza. În plus, *Taq* polimeraza este lipsită de activitate 3',5'-exonucleazică de corectură, astfel încât uneori se înregistrează rate relativ mari de încorporare greșită. Prin contrast, *Pfu* nu ridică acest tip de probleme, ceea ce va determina ca ea să devină enzima de elecție pentru PCR, mai ales acolo unde se cere o înaltă fidelitate în copierea ADN, cum ar fi clonarea pentru exprimarea unor proteine. În plus, la temperatura camerei, *Pfu* are o activitate pe jumătate față de *Taq*, ceea ce are drept efect reducerea extensiei nespecifice a primerilor de start la rece. În cazul *Pfu* s-a calculat o rată de eroare de $1–2 \times 10^{-6}$ față de $1,5–2,5 \times 10^{-5}$ pentru *Taq*, ceea ce corespunde la o frecvență de mutație de 0,35–0,60% la *Pfu* comparativ cu 4,3–7,3% la *Taq*. Aceasta înseamnă că amplificând o secvență de 1 kb în cursul a 20 de cicluri efective cu *Taq*, pot apărea 40% mutații, pe când lucrând cu *Pfu* incidența este doar de 3%. În general, se recomandă adăugarea a 1–2,5 unități enzimatice/reacție, o concentrație prea mare putând produce un fond ridicat de produse nespecifice, iar una prea mică ar avea ca efect obținerea unei cantități insuficiente de produs de interes.

Deoxiribonucleozidtrifosfații. Aceștia trebuie să prezinte suficientă stabilitate individuală, așa încât să rămână activi cel puțin în proporție de 50% după 50 de cicluri de lucru. În domeniul 20–200 μM se asigură un bun echilibru între randamentul/specificitatea/fidelitatea reacției. Se preferă lucrul cu cantități echivalente, pentru evitarea încorporării eronate. În domeniul concentrațiilor mai mici, cresc specificitatea și fidelitatea de replicare.

Concentrația Mg^{2+}. Una dintre variabilele-cheie ale PCR este concentrația ionilor Mg^{2+}; ea este un factor esențial al specificității și al cantității de produs de amplificare obținut. Concentrația prea mare de ioni Mg^{2+} stabilizează ADNdc, prevenind totodată denaturarea produsului inițial, reducând nivelul produsului amplificat. De asemenea, excesul de Mg^{2+} poate stabiliza ordonarea (*annealing*) aleatorie a primerilor la ținte incorecte, determinând obținerea de nivele crescute de produse nedorite și, deci, specificitate mică.

Pe de altă parte, concentrația scăzută de Mg^{2+} (sub 0,2 μM) — cu rol de cofactor enzimatic al celor mai multe ADN polimeraze și sigur al celor termostabile — nu permite extensia primerilor. Parțial, ionii de Mg^{2+} vor fi chelatați de către dNTP din amestecul de reacție, de aceea va exista mereu o concentrație optimă de Mg^{2+} care va mări specificitatea reacției, atunci când toate celelalte condiții vor rămâne constante. Pentru așa-numitele „regiuni recalcitrante“ (cu conținut ridicat G+C), amplificarea eficientă este înlesnită de o concentrație relativ mică de ioni Mg^{2+}.

Prezența ionilor bivalenți influențează ordonarea primerilor, precum și temperatura de disociere a catenelor complementare (denaturarea). O concentrație anumită de Mg^{2+} împiedică formarea unor dimeri de primeri, influențând favorabil activitatea și fidelitatea ADN polimerazei. Prezența EDTA sau a altor chelatori afectează reacția PCR.

În afară de concentrația de ioni de Mg^{2+}, reacția de amplificare polimerazică mai este influențată în mod critic de mediul ionic furnizat de tampon. Regiunile bogate în G+C se amplifică bine prin PCR atunci când mediul este bazat pe NaCl, probabil prin favorizarea denaturării. Tampoanele cu $(NH_4)_2SO_4$ au fost utilizate printre primele în studiile de PCR, acum fiind reluate mai ales pentru lucrul cu noile enzime termostabile recomandate, de exemplu pentru *Pfu*. Prezența sărurilor de amoniu înlătură artefactele (decelate în electroforeză ca benzi de masă moleculară mică) produse de *Taq* polimerază prin extensia incompletă a produselor de amplificare. În plus, aceste tampoane conțin substanțe de tipul Triton X-100 sau gelatină, cu rol în stabilizarea proteinei enzimatice de-a lungul ciclurilor de reacție.

5.1.4. Primerii. Primerii sunt secvențe oligonucleotidice cu o lungime de 18–20 de baze, cu un conținut de 50–60% G+C și având T_m=55^0-80^0C. În designul lor trebuie evitată complementarizarea, îndeosebi la capetele 3’, ceea ce se poate realiza uneori prin înlocuirea dGTP cu 7deaza-2’deoxiguanozintrifosfat, pe care *Taq* polimeraza o încorporează după o cinetică similară, fără afectarea fidelității globale a PCR, produsul final putând fi clonat în *E. coli* sau secvențializat.

Mai mult chiar, niciunul dintre primeri nu ar trebui să aibă 3’T, acesta fiind nucleotidul cel mai puțin discriminatoriu (primerii de acest tip au o mare toleranță la împerecheri greșite), în mod general protocoalele de lucru recomandând ca în tripleta 3’ consecutiv cu G sau C să existe cel puțin o A sau T.

În structura secvențelor de primeri pot fi introduse situsuri pentru enzimele de restricție, codoni ATG de start sau nucleotide din secvențe promotor, polilinkeri pentru clonare sau situsuri pentru mutații.

6.2. VARIANTE DE REACȚII DE AMPLIFICARE

6.2.1. Invers-PCR este o variantă care permite amplificarea unor regiuni ADN de secvență necunoscută, flancate de zone cu secvență cunoscută. Prima etapă presupune restricția enzimatică în interiorul regiunilor cu secvențe necunoscute în scopul obținerii a două capete de acid nucleic compatibile. Regiunea astfel delimitată se circularizează prin ligare, iar primerii se sintetizează pentru secvențele ADN cunoscute (fig. 20).

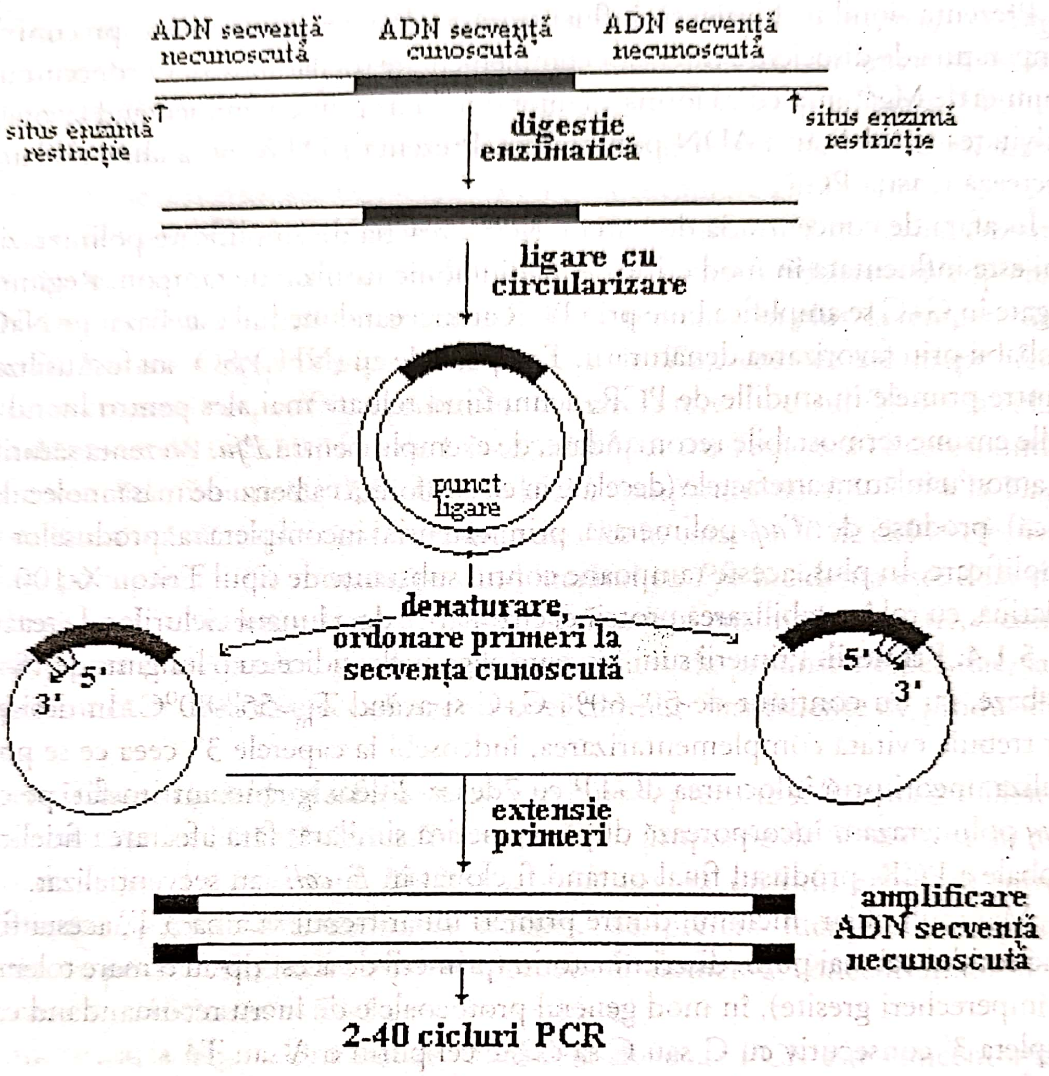

ADN secvență necunoscută
ADN secvență cunoscută
ADN secvență necunoscută
situs enzimă restricție
digestie enzimatică
situs enzimă restricție
ligare cu circularizare
punct ligare
denaturare, ordonare primeri la secvența cunoscută
5'
3'
5'
3'
extensie primeri
amplificare ADN secvență necunoscută
2-40 cicluri PCR

Fig. 20 — Schema invers-PCR.

Deci PCR permite amplificarea ADN, ceea ce îi asigură succesul comercial.

6.2.3. SR (*self sustained sequence replication*). Este o tehnică oarecum înrudită cu PCR, în condiții izoterme (37^0-42^0C), deci fără cicluri termice, cu timpi de reacție mai scurți decât PCR (105 copii/15 min de 3SR față de 85 min în PCR, pentru același număr de copii); în acest caz, se pornește de la ARN, care se degradează pe parcurs (fig. 21):

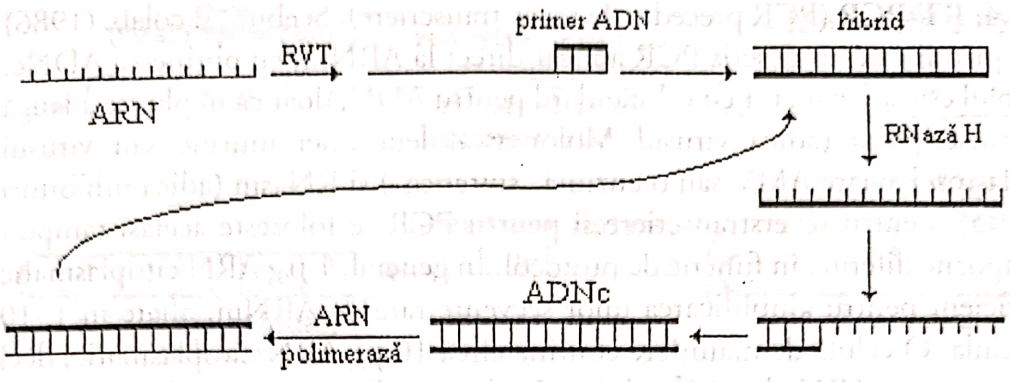

primer ADN
hibrid
RVT
ARN
RNază H
ADN
ADNc
ARN
polimerază

Fig. 21 — Schema 3SR.

6.2.3. LCR (*ligase chain reaction*). Tehnica se bazează pe următoarele, prin comparație cu amplificarea obișnuită: PCR generează noi molecule de ADN din nucleotidele individuale, pe când LCR utilizează enzima termostabilă pentru ligarea unor oligonucleotide adiacente. Este tot o reacție ciclică — denaturare/ordonare/ligare — oligonucleotidele cuplate complementar devenind matriță în etapele ulterioare. In LCR este necesară cunoașterea integrală a secvenței ADN-țintă, deoarece o împerechere greșită poate împiedica ligarea (fig. 22):

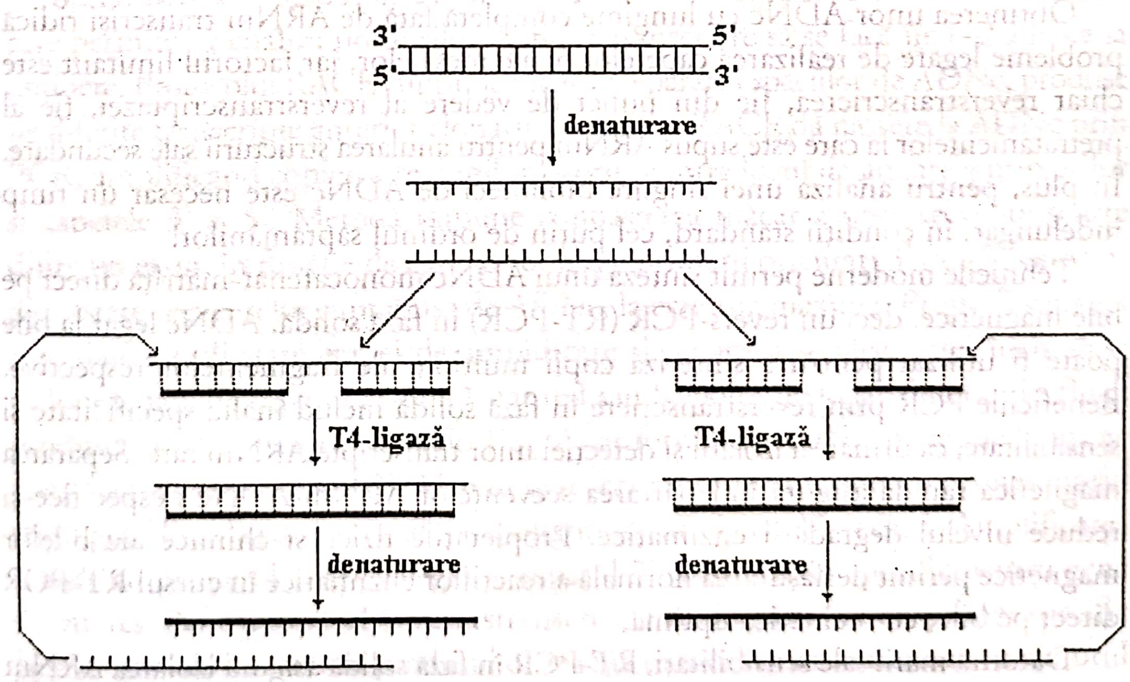

3'
5'
5'
3'
denaturare
T4-ligază
T4-ligază
denaturare
denaturare

Fig. 22 — Schema LCR.

6.2.4. RT-PCR (PCR precedat de reverstranscriere). Seeburg și colab. (1986) au fost primii care au descris PCR aplicat direct la ARNm, cu obținerea ADNc. Protocolul este asemănător cu cel standard pentru ADN, doar că în plus se adaugă reverstranscriptază (adică virusul Moloney al leucemiei murine sau virusul mieloblastozei aviare AMV sau o enzimă „sintetică“) și RNasin (adică inhibitori de RNază). Pentru reverstranscriere și pentru PCR se folosește același tampon sau tampoane diferite, în funcție de protocol. În general, 1 µg ARN citoplasmatic este suficient pentru amplificarea unor secvențe rare de ARNm, aflate în 1–10 copii/celulă. O celulă de mamifere conține circa 10 pg ARN citoplasmatic, deci 1 µg reprezintă ARN din 10^5 celule. Cînd se analizează o populație celulară omogenă nu este nevoie de separat poliA-ARN. Ca amorsă de reverstranscriere se pot utiliza fie hexaprimeri aleatori (care asigură amplificarea nespecifică a ARN), fie primerul antisens — utilizat apoi în reacția propriu-zisă de PCR.

Când se studiază ARNm eucariot se recomandă ca primerii să fie derivați din exoni distincți, ceea ce va inhiba amplificarea și contaminarea cu produse nedorite provenite din ADN respectiv. Dacă nu se cunoațte structura genomului se folosesc primeri separați prin 300–400 de baze, din zona 5' a regiunii codificatoare. Întrucât la vertebrate exonii mai mari de 300 de baze sunt rari, există șanse ca primerii să aparțină cu adevărat unor exoni diferiți. Dacă gena nu are introni sau se studiază ARNm bacterian, ARN viral sau transcripți virali, este nevoie de tratarea ARN cu DNază pentru obținerea unor rezultate bune în PCR, evitându-se contaminarea.

Obținerea unor ADNc cu lungime completă față de ARNm transcriși ridică probleme legate de realizarea capetelor 5' ale mesajelor, iar factorul limitant este chiar reverstranscrierea, fie din punct de vedere al reverstranscriptazei, fie al pretratamentelor la care este supus ARNm pentru anularea structurii sale secundare. În plus, pentru analiza unei singure biblioteci de ADNc este necesar un timp îndelungat, în condiții standard, cel puțin de ordinul săptămânilor!

Tehnicile moderne permit sinteza unui ADNc monocatenar-matriță direct pe bile magnetice, deci un revers-PCR (RT-PCR) în fază solidă. ADNc legat la bile poate fi utilizat pentru a sintetiza copii multiple ale fragmentelor respective. Beneficiile PCR prin reverstranscriere în fază solidă includ înalta specificitate și sensibilitate, ca urmare a izolării și detecției unor transcripte ARNm rare. Separarea magnetică rapidă asigură îndepărtarea secvențelor ARNm/ADNc nespecifice și reduce nivelul degradării enzimatice. Propietățile fizice și chimice ale bilelor magnetice permit desfășurarea normală a reacțiilor enzimatice în cursul RT-PCR direct pe bile, cu o cinetică optimă.

Datorită marii sale sensibilități, RT-PCR în fază solidă asigură izolarea ARNm pornind de la minim 2 celule/probă. Reverstranscrierea este apoi efectuată pe primerii oligo(dT) legați covalent la bile printr-un procedeu standard (fig. 23).

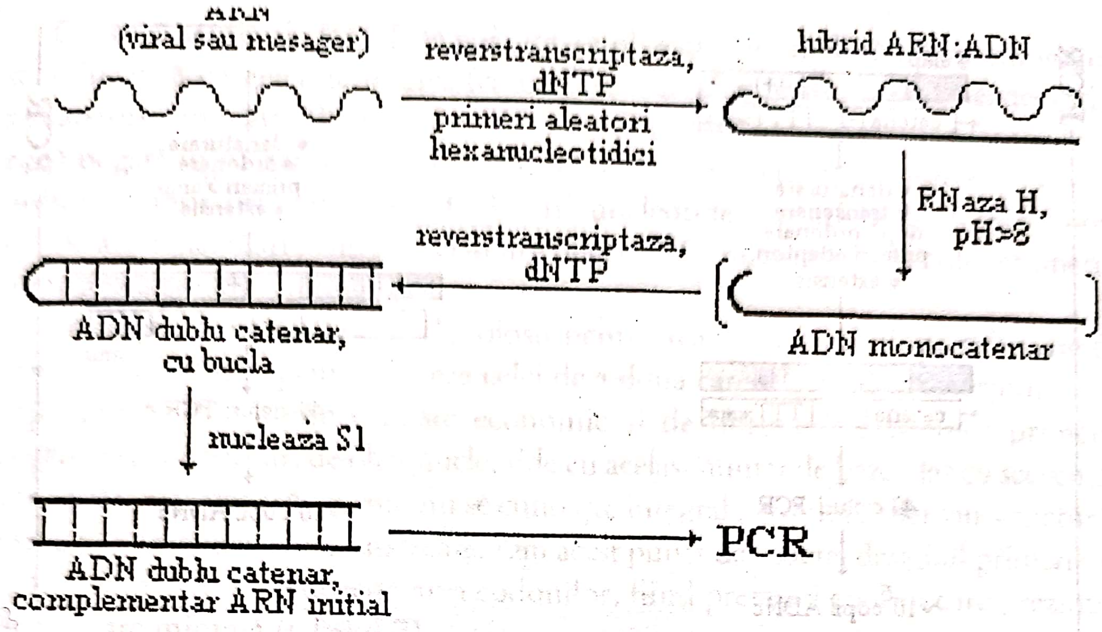
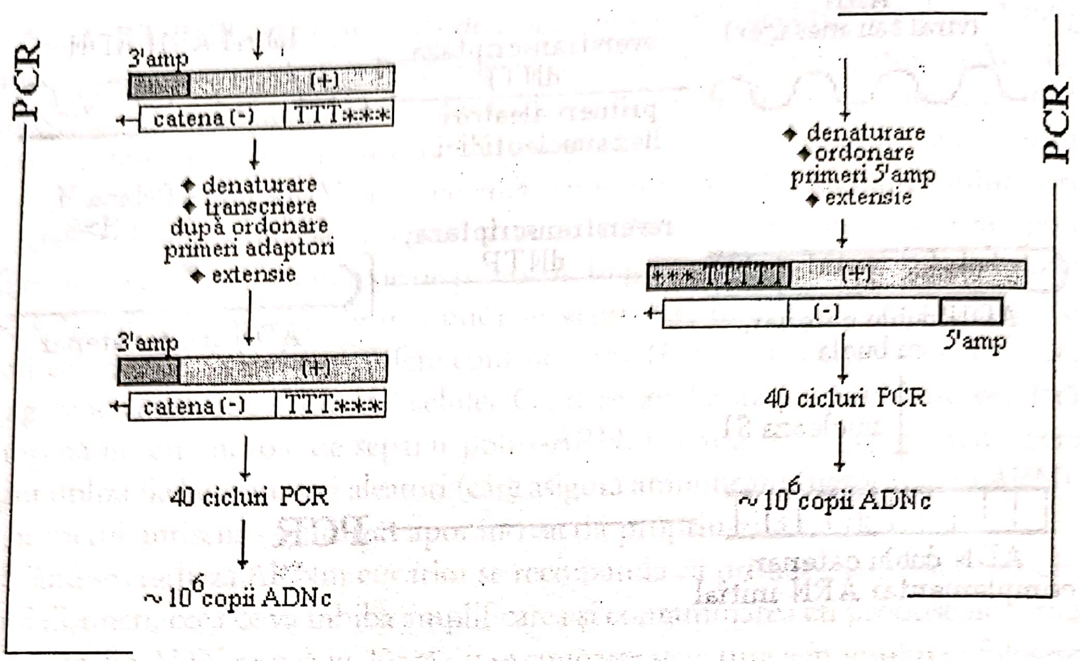

ARN
(viral sau mesager)
reverstranscriptaza, dNTP
primeri aleatori hexanucleotidici
hibrid ARN:ADN
RNaza H, pH>8
reverstranscriptaza, dNTP
ADN dublu catenar, cu bucla
ADN monocatenar
nucleaza S1
PCR
ADN dublu catenar, complementar ARN inițial

Fig. 23 — Schema RT-PCR.

După izolarea magnetică a ARNm, se adaugă un primer 5'-specific și se sintetizează prima catenă de ADNc, monocatenar, necesară sintezei ulterioare a ADNc dublu catenar, utilizat în PCR standard.

6.2.5. RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*. Este o variantă îmbunătățită, care permite ca analiza produșilor de reverstranscriere să se facă în 1–2 zile de la obținere. Protocolul RACE cuprinde inclusiv separarea speciilor de ADNc, produse pe diferite transcripte anterior clonării. În esență, RACE dă naștere la ADNc prin PCR, amplificând copierea regiunilor cuprinse între locul de atașare a primerilor și capetele 3' și 5'. Metoda impune cunoașterea măcar a unei secvențe scurte dintr-un exon, în funcție de care se vor alege primerii orientați 3' sau 5', care vor da naștere secvențelor suprapuse de ADNc, la extensia maximă. Primerii sunt cei care dau specificitate etapei de amplificare și de aceea se aleg astfel încît să se ordoneze față de capătul 3'-poliA natural sau 5'-poliA adăugat sintetic. În final, produsele RACE pentru capatele 3' și 5' vor forma un ADNc intact, de lungime completă. Pentru capătul 3', ARNm se reverstranscrie utilizând un primer hibrid cu oligo(dT)$_{17}$ legat de un adaptor oligonucleotidic cu 17 resturi. Amplificarea se face cu primerul adaptor legat la capătul 3' și cu primer specific pentru gena de interes. Pentru capătul 5' reverstranscrierea are loc doar cu un primer specific pentru gena de interes. La produsul de reacție monocatenar se atașează cu ajutorul transferazei terminale o coadă poliA. Amplificarea are loc între primerul hibrid amintit și primerul specific genei, situat în aval de primul (fig. 24).


PCR
3'amp
(+)
catena (-)
TTT***
◆ denaturare
◆ transcriere
după ordonare
primeri adaptori
◆ extensie
3'amp
(+)
catena (-)
TTT***
40 cicluri PCR
~10^6 copii ADNc
◆ denaturare
◆ ordonare
primeri 5'amp
◆ extensie
***TTTTT
(+)
(-)
5'amp
40 cicluri PCR
~10^6 copii ADNc
PCR

*****5'GACTCGAGTCGACATCG adaptor, cu situsuri pentru Xho I, Cla I, Sal I;
3'amp, 5'amp - primeri specifici genei de interes, complementari catenelor (+) şi (-).

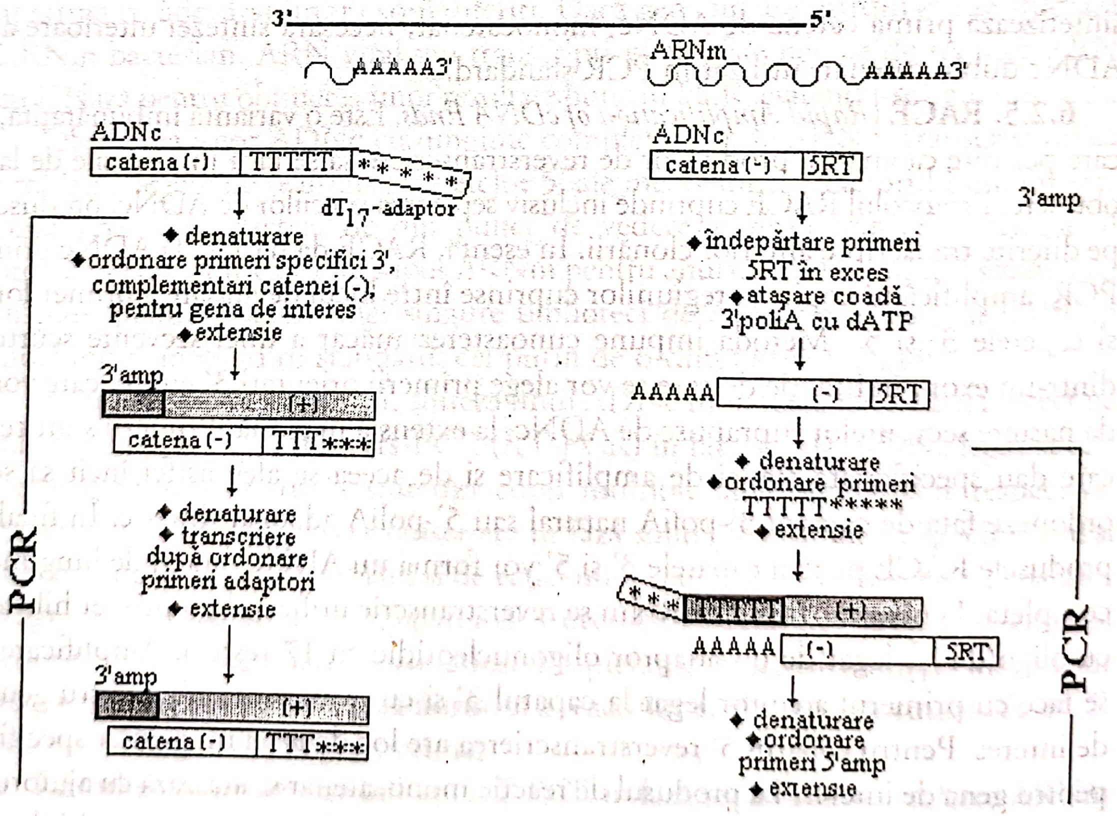

3'
5'
ARNm
AAAAA3'
AAAAA3'
ADNc
catena (-)
TTTTT
*****
dT17-adaptor
◆ denaturare
◆ ordonare primeri specifici 3',
complementari catenei (-),
pentru gena de interes
◆ extensie
3'amp
(+)
catena (-)
TTT***
◆ denaturare
◆ transcriere
după ordonare
primeri adaptori
◆ extensie
3'amp
(+)
catena (-)
TTT***
PCR
ADNc
catena (-)
5RT
3'amp
◆ îndepărtare primeri
5RT în exces
◆ ataşare coadă
3'poliA cu dATP
AAAAA
(-)
5RT
◆ denaturare
◆ ordonare primeri
TTTTT*****
◆ extensie
***TTTTT
(+)
AAAAA
(-)
5RT
◆ denaturare
◆ ordonare
primeri 5'amp
◆ extensie
PCR

Fig. 24 — Schema RACE.

Ca dezavantaje ale RACE se pot cita amplificarea unor ADNc fără omologie semnificativă cu gena de interes (ca urmare a alegerii unor primeri neadecvați) sau apariția unor ADNc 3'truncați (din cauza ordonării primerului adaptor la o zonă bogată în A, dar diferită de capătul 3'poliA). În ceea ce privește capătul 5', utilizarea unor primeri scurți de 12–16 nucleotide, bogați în A+T și a unor temperaturi mai mari pentru reverstranscriere (52^0C) micșorează pericolul obținerii unor produși nespecifici.

Primerul adaptor oligo$(dT)_{17}$ folosit pentru reacția de amplificare 3' poate fi utilizat și ca primer pentru sinteza celei de a doua catene a ADNc corespunzător capătului 5'. De multe ori este economic și de dorit folosirea unor primeri degenerați (amestecuri de oligonucleotide cu același număr de baze, dar cu secvență variabilă), mai ales atunci cînd nu se cunoaște integral secvența genei sau structura primară a proteinei corespunzătoare. Din acest punct de vedere, designul primerilor se face ținînd cont de degenerarea codonilor, fiind preferați codoni care prezintă degenerare minimă (tabelul 7).

Tabelul 7 — Corespondența aminoacizi-codoni

Aminoacid	Nr. codoni
Met, Trp	1
Cys, Asp, Glu, Phe, His, Lys, Asn, Gln, Tyr	2
Ile	3
Ala, Gly, Pro, Thr, Val	4
Leu, Arg, Ser	6

6.2.6. MOPAC (*Mixed Oligonucleotide Primed Amplification of cDNA*). Trebuie ținut cont că un primer are 15–20 nucleotide, adică mesajul pentru 5–7 aminoacizi care trebuie bine precizați în proteina a cărei genă se studiază. Pentru a înlesni unele studii, eventual primerul poate include un situs de restricție. Acest gen de primeri se utilizează în cadrul variantei MOPAC. Primerii cei mai adecvați urmează să se ordoneze selectiv la matriță, în competiție cu cei mai puțin specifici. S-a constatat cu surprindere că pentru o bună reușită a PCR în MOPAC nu este nevoie de o împerechere perfectă, ci există o toleranță de circa 20% între ținta-matriță și amorse. MOPAC funcționează nu numai cu ARNm-poliA izolat, ci și cu ARN total, iar denaturarea hibrizilor ADN:ARN formați pe parcurs se realizează termic, fără a mai fi nevoie de mediul alcalin pentru hidroliza ARN. În desfășurarea

MOPAC se recomandă ca ARNm să provină de la aceeași specie de la care derivă și proteina pe baza căreia s-a făcut designul primerilor.

6.2.7. PCR asimetric. Uneori se urmărește ca după PCR să se facă direct determinarea secvenței, fără clonarea prealabilă a produsului obținut, ceea ce a determinat punerea la punct a unor variante modificate de PCR în care să rezulte doar ADN complementar monocatenar corespunzător catenei alese. În acest scop, se utilizează cantități inegale din cei doi primeri (fig. 25):

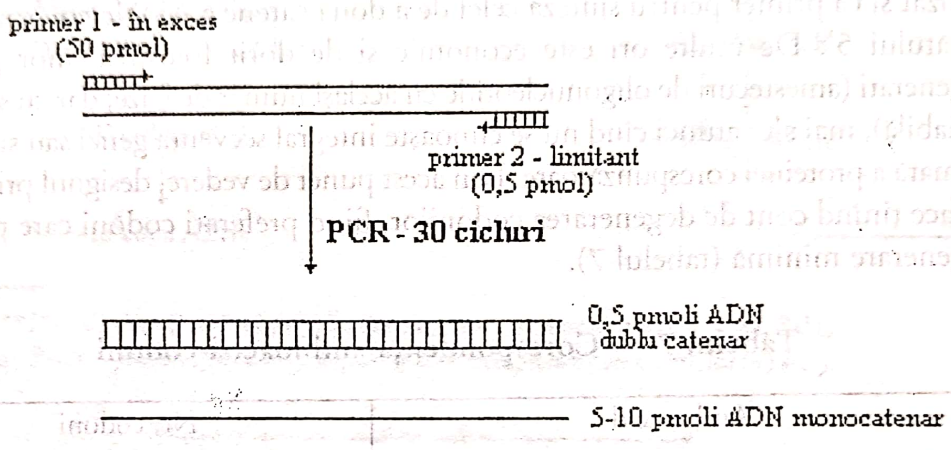


Fig. 25 — Schema PCR asimetric.

În cursul primelor 15–20 cicluri cea mai mare parte a produsului sintetizat este bicatenară și se acumulează exponențial. În continuare, primerul în exces duce doar la amplificarea unei singure catene, iar acest ADNmc se acumulează liniar, în funcție de concentrația primerului excedentar. Matrița monocatenară poate fi apoi secvențializată cu același primer folosit la obținere sau cu un al treilea primer intern, care conferă un grad sporit de specificitate. Oricum, PCR asimetric este mai puțin productiv decât PCR standard, fiind necesare mai multe cicluri pentru atingerea unui randament convenabil. Lungimea optimă a ADN țintă de amplificat prin PCR asimetric este de 1 kb, iar concentrația dNPT este mai mică decât la procedeul standard.

Pentru obținerea fragmentelor PCR utilizate în clonare, la capetele 5' ale primerilor se adaugă situsuri pentru enzimele de restricție, manevra fiind posibilă pe seama câtorva nucleotide necomplementare cu ADN-țintă (un primer tipic are 15–30 nucleotide complementare integral cu ținta, iar în cazul dat, primerii sunt precedați de 4–8 nucleotide reprezentând situsul de recunoaștere și tăiere al unei anumite restrictaze). Adiția de extranucleotide la capetele 5' ale primerilor nu interferă cu eficiența PCR, ADN polimeraza *Taq* adăugând ea însăși extranucleotide la capetele matriței, pe parcursul sintezei. Prin aceeași tehnică se pot adapta fragmentele de amplificare în scopul clonării, prin adăugarea de polilinkeri.

6.2.8. Anchor PCR. Este o altă variantă a tehnicii PCR, în cadrul căreia pot fi amplificate secvențele ADN sau ARN cu capete variabile. La capetele 3' ale ADNc obținut prin RT se atașează, cu ajutorul deoxinucleotidiltransferazei, o coadă poli(dG) care hibridizează cu capătul 5'-poli(dC) al primerului ancorat. În continuare, se desfășoară reacția PCR standard, care amplifică acest ADN (fig. 26):

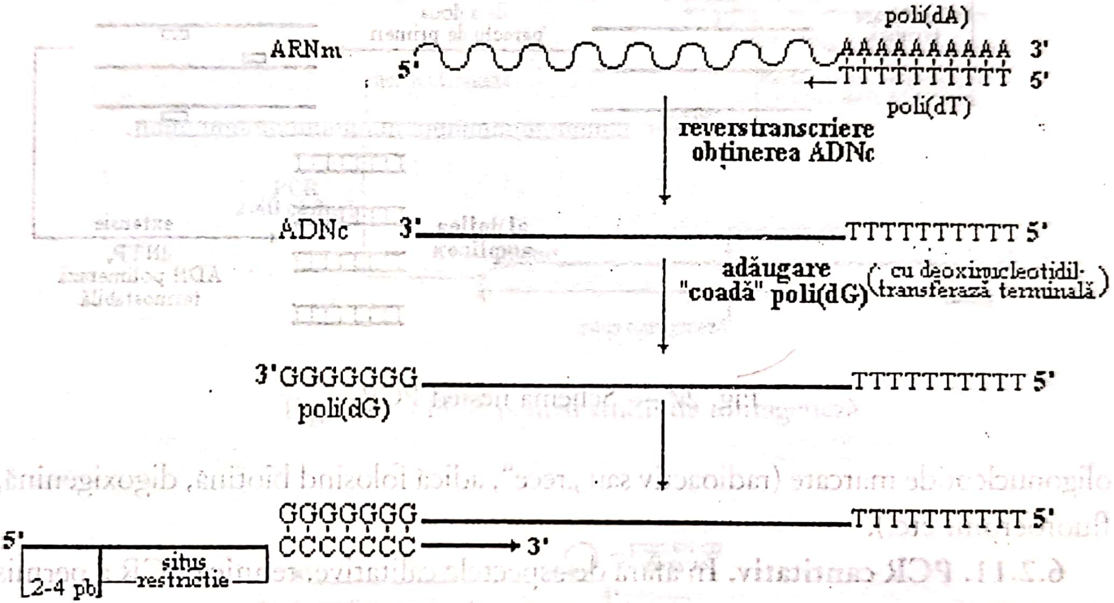

poli(dA)
ARNm
5'
AAAAAAAAAA 3'
TTTTTTTTTT 5'
poli(dT)
reverstranscriere
obținerea ADNc
ADNc
3'
TTTTTTTTTT 5'
adăugare
"coadă" poli(dG)
(cu deoxinucleotidil-
transferază terminală)
3'GGGGGGG
TTTTTTTTTT 5'
poli(dG)
GGGGGGG
TTTTTTTTTT 5'
5'
CCCCCCC
3'
situs
restricție
2-4 pb

Fig. 26 — Schema anchor-PCR.

6.2.9. Nested PCR realizează o dublă amplificare prin utilizarea a două perechi de primeri diferiți. Prima rundă de amplificare folosește două amorse situate la distanță mai mare una de cealaltă, eventual din regiunea înalt conservată a genomului de investigat, iar în cea de a doua etapă, primerii sunt situați în regiuni apropiate sau în cele care pot duce la discriminarea genotipurilor înrudite (fig. 27).

6.2.10. PCR *in situ*. Izolarea țintei ADN sau ARN, anterior amplificării prin PCR, este una dintre limitele acestei tehnici. Posibilitatea de a efectua PCR *in situ* elimină acest dezavantaj și, mai mult, furnizează date asupra localizării celulare a secvenței nucleotidice urmărite, cu conservarea caracteristicilor citologice și histologice ale preparatelor biologice studiate. Tehnica este aplicată țesuturilor înghețate sau parafinate, prelucrate recent sau chiar mai vechi. Evidențierea rezultatelor pozitive se face prin incorporarea în amestecul de reacție a unor

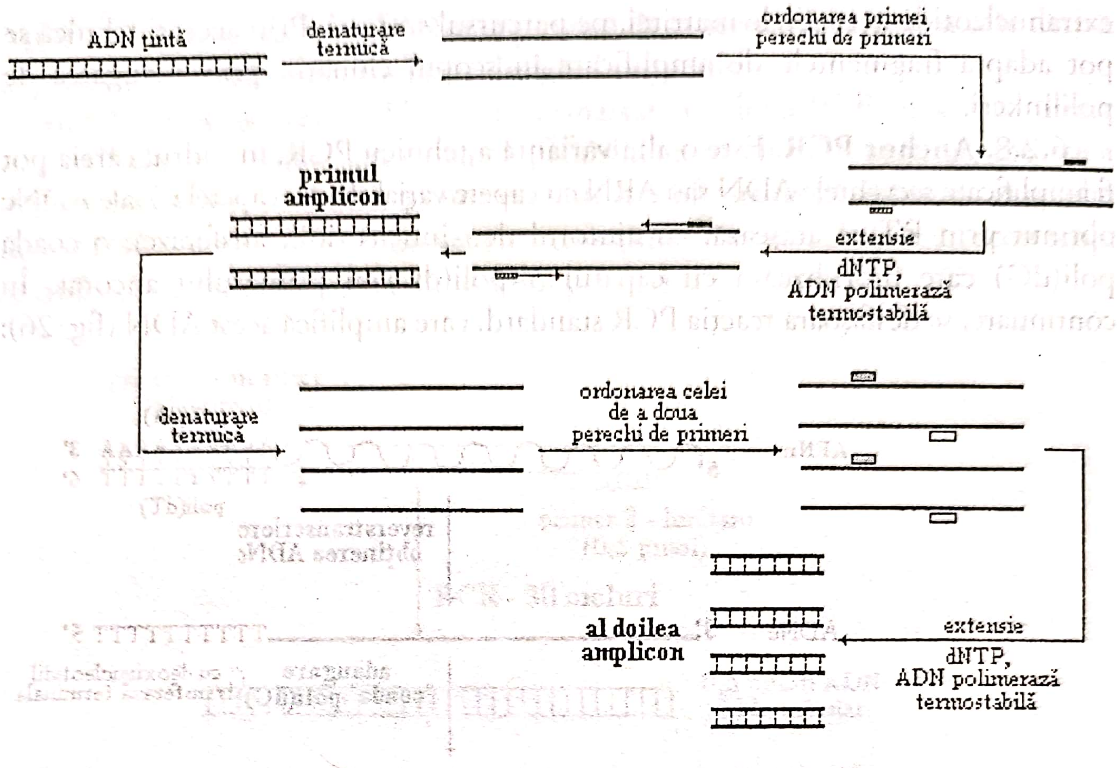

ADN țintă
denaturare termică
ordonarea primei perechi de primeri
primul amplicon
extensie
dNTP,
ADN polimerază termostabilă
denaturare termică
ordonarea celei de a doua perechi de primeri
al doilea amplicon
extensie
dNTP,
ADN polimerază termostabilă

Fig. 27 — Schema nested PCR.

oligonucleotide marcate (radioactiv sau „rece“, adică folosind biotină, digoxigenină, fluorocromi etc.).

6.2.11. PCR cantitativ. În afară de aspectele calitative, tehnica PCR a permis și stabilirea unor aspecte cantitative, privind cuantificarea anumitor secvențe nucleotidice. Pentru cuantificare este necesar un standard intern (lucrat concomitent cu proba de analizat), care constă în existența unui număr precizat de copii ale unei secvențe omoloage cu cea de cercetat.

6.2.12. Alte aplicații. Una dintre cele mai importante aplicații PCR este identificarea și analiza mutațiilor în ADN eucariot (fig. 28).

Inserțiile (fig. 29) și delețiile (fig. 30) pot fi decelate prin modificarea dimensiunilor produșilor PCR sau, în absența produsului de amplificare, dacă în aria delețiilor este cuprins și primerul.

Mutațiile pot fi identificate prin hibridizarea ampliconilor ADN cu sonde ARN și digestia duplexului cu RNază A (digestia va apare în condițiile prezenței *mismatch*-urilor în duplex). Peste 23 de mutații ale genelor umane și defecțiuni ale alelelor lincate au fost diagnosticate prin PCR (uneori diagnosticul efectuându-se prenatal) și peste 30 de organisme patogene au fost identificate în probe clinice).

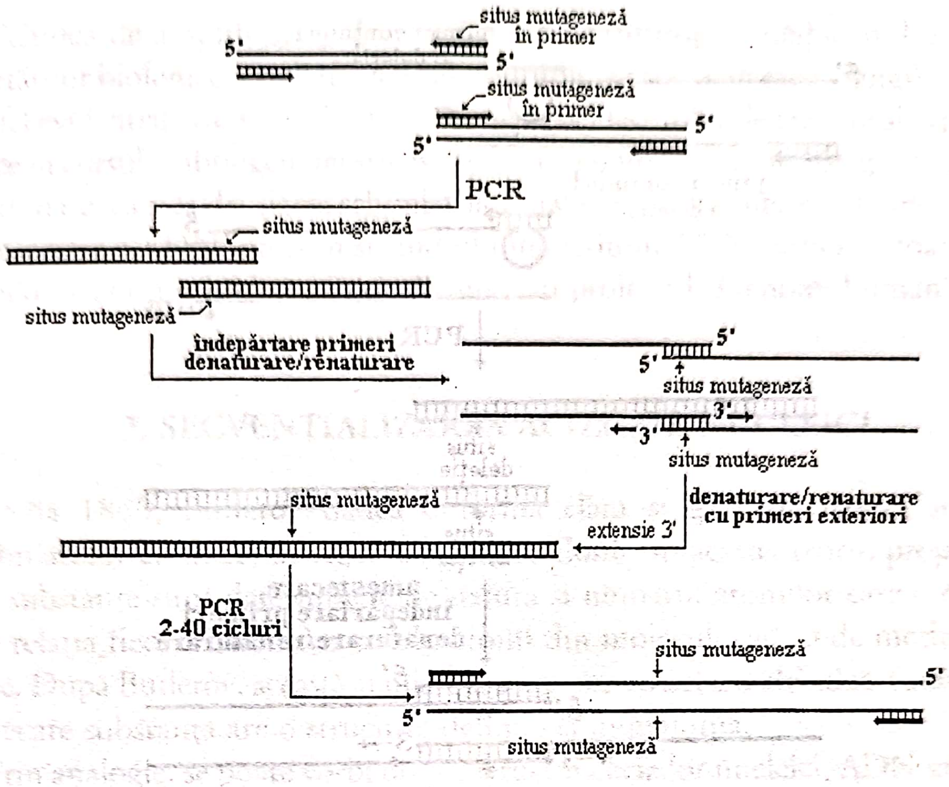

situs mutageneză în primer
5'
5'
situs mutageneză în primer
5'
5'
PCR
situs mutageneză
situs mutageneză
îndepărtare primeri
denaturare/renaturare
5'
5'
situs mutageneză
3'
3'
situs mutageneză
situs mutageneză
denaturare/renaturare cu primeri exteriori
extensie 3'
PCR
2-40 cicluri
situs mutageneză
5'
5'
situs mutageneză

Fig. 28 — PCR pentru studii de mutageneză.

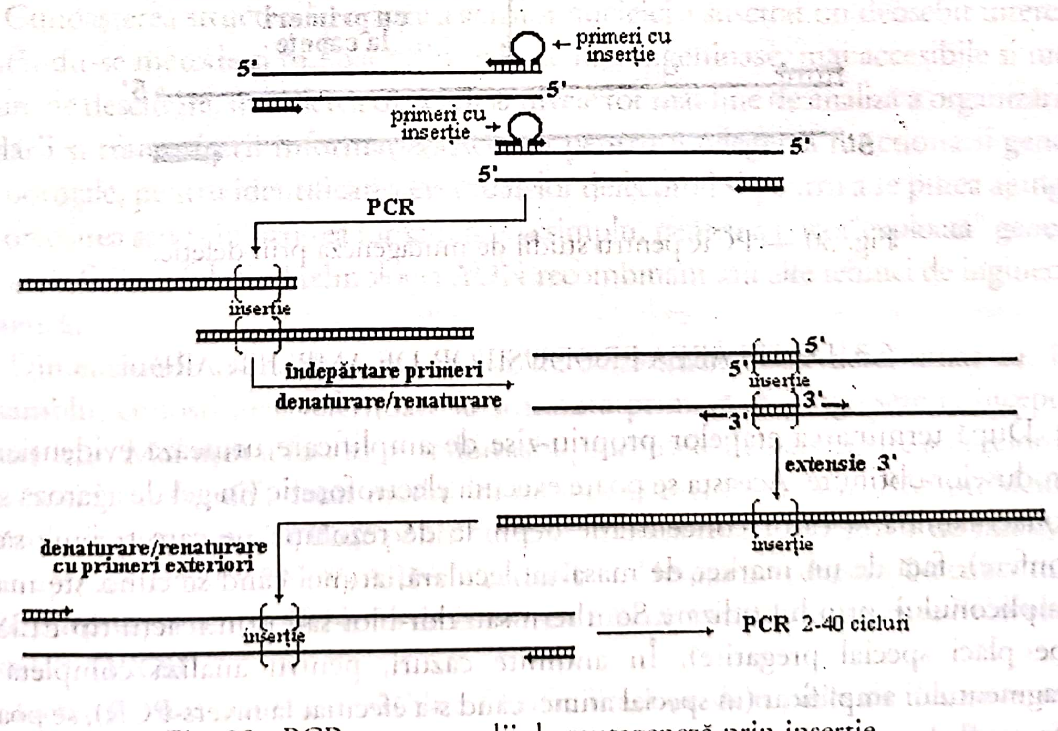

primeri cu inserție
5'
5'
primeri cu inserție
5'
5'
PCR
inserție
îndepărtare primeri
denaturare/renaturare
5'
5'
inserție
3'
3'
extensie 3'
inserție
denaturare/renaturare cu primeri exteriori
inserție
PCR 2-40 cicluri

Fig. 29– PCR pentru studii de mutageneză prin inserție.

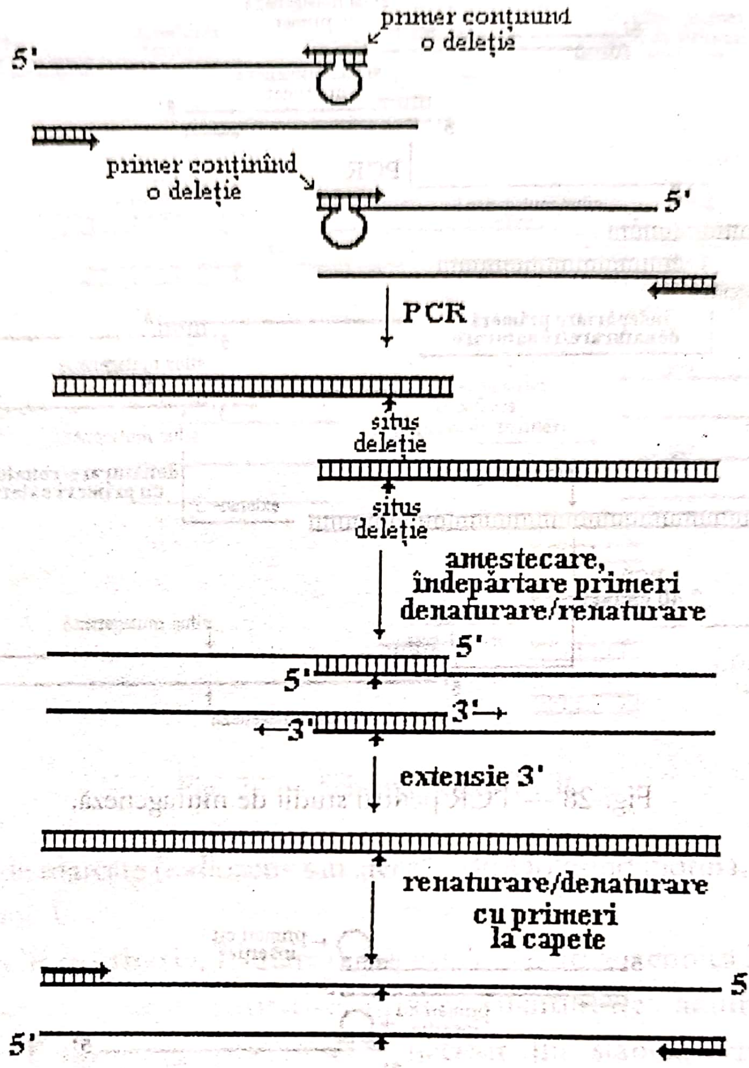

primer conținînd o deleție
5'
primer conținînd o deleție
5'
PCR
situs deleție
situs deleție
amestecare, îndepărtare primeri denaturare/renaturare
5'
5'
3'
3'
extensie 3'
renaturare/denaturare cu primeri la capete
5'
5'

Fig. 30 — PCR pentru studii de mutageneză prin deleție.

6.3. DECELAREA PRODUȘILOR DE AMPLIFICARE

După terminarea etapelor propriu-zise de amplificare urmează evidențierea produselor obținute. Aceasta se poate executa electroforetic (în gel de agaroză sau poliacrilamidă, a căror concentrație depinde de rezoluția pe care trebuie să o confere), față de un marker de masă moleculară, atunci când se cunoaște masa ampliconului, prin hibridizare Southern sau dot-blot sau prin reacții tip ELISA (pe plăci special pregătite). În anumite cazuri, pentru analiza completă a fragmentului amplificat (în special atunci când s-a efectuat la invers-PCR), se poate recurge la secvențializare.

Tehnica de amplificare polimerazică a avut un impact major în dezvoltarea cercetărilor biologice: acizii nucleici ai unor celule care cresc greu (fungi) au putut fi astfel evidențiați sau s-a realizat analiza expresiei factorilor de creștere ai exprimării genice în cursul embriogenezei și a examinării recombinărilor omoloage în celulelele embrionare, ca și la decelarea schimbărilor nucleotidice rezultate din evenimentele de procesare a ADN, precum și studiul interacțiunii ADN-proteine, toate aceste cercetări având un impact major, inclusiv în proiectul „Genomul uman“.

7. SECVENȚIALIZAREA ACIZILOR NUCLEICI

Pe la 1860, Butlerov dădea o formă clară și generală teoriei structurii combinațiilor chimice, în vigoare și astăzi. Conform acestei teorii, proprietățile unei substanțe sunt determinate de natura și numărul atomilor care o compun și de relația fiecărui atom cu ceilalți atomi din moleculă, adică de modul lor de legare. După Butlerov, această aranjare se numește **structura chimică a substanței**, iar fiecare substanță are o structură definită și numai una.

Prin analogie, se poate vorbi despre structura acizilor nucleici, ADN sau ARN, la baza căreia stă aranjamentul reciproc al celor patru baze azotate principale caracteristice (A, G, C, U — pentru ARN și A, G, C, T — pentru ADN), precum și a unor baze minore, întâlnite în cazuri particulare.

Cunoașterea structurii primare a acizilor nucleici a suscitat un deosebit interes, căutându-se metode și mijloace din ce în ce mai ingenioase, mai accesibile și mai sigure de descifrare, în vederea disecării la nivele tot mai fine de analiză a organizării, reglării și transmiterii informației. Aceasta pentru înțelegerea funcționării genelor normale, pentru identificarea eventualelor defecțiuni și pentru a se putea ajunge la corectarea sau la înlocuirea lor sau, pur și simplu, pentru a putea“exploata“ genele cât mai eficient, folosind tehnologia ADN recombinant sau alte tehnici de inginerie genetică.

Dimensiunile mari ale moleculelor de acizi nucleici au determinat ca, în ansamblu, cunoștințele referitoare la structura primară să progreseze la început foarte lent. Mai ușor a fost să se stabilească procentele de participare a bazelor la compoziția moleculei, decât modul lor de succesiune. Până prin 1965 problema era soluționată complet doar pentru ARNt^{Ala}, moleculă cu circa 75 de nucleotide, apoi au urmat ARNt^{Ser}, ARNt^{Tyr}, ARNt^{Phe}. Un pas mai departe l-a constituit determinarea secvenței ARNr 5S de *E. coli*, cu 120 de nucleotide, de către Brownlee și colab. (1968).

Determinarea structurii ARNt a fost facilitată pe de o parte de descoperirea acțiunii de hidroliză selectivă a unor RNaze, cum ar fi RNaza T1 din takadiastază, iar pe de altă parte de dezvoltarea metodelor de analiză cromatografică, de exemplu cea pe coloane lungi de DEAE-celuloză, cu uree 7M ca eluant.

În urma studiilor de acest tip, efectuate pe molecule de ARNt, s-a ajuns definitiv la concluzia că acizii nucleici sunt constituiți din lanțuri liniare, în care mononucleotidele sunt legate 3',5'-fosfodiesteric.

La ora actuală, studiul complex a tot mai numeroase molecule de acizi nucleici se abordează după definirea structurii lor chimice. În unele cazuri — cum ar fi acizii nucleici virali sau ARNm sau ARNt — este vorba de sisteme omogene și monodisperse. În cazul altor acizi nucleici — ARN ribozomali sau alte specii — apar sisteme heterogene și disperse, a căror structură este mai dificil de descifrat.

Oricum, pentru abordarea practică a problemei stabilirii structurii primare, adică a secvenței, trebuie rezolvat în primul rând aspectul legat de obținerea produsului în stare corespunzătoare de puritate și integritate moleculară pentru o analiză concludentă. De aceea, unele etape și operații premergătoare pot fi nu numai importante, ci de-a dreptul hotărîtoare.

Materialul biologic supus extracției conduce, după separare, la un produs care de obicei este folosit la identificare, pe baza unei (unor) proprietăți caracteristice; apoi, urmează purificarea sau eventual fracționarea produsului de interes și se ajunge la materialul de analizat.

7.1. SECVENȚIALIZAREA ADN

Din punct de vedere cronologic, tehnicile de secvențializare pentru ADN sunt cu peste zece ani mai tinere decât tehnicile de determinare a secvenței moleculelor de ARN, dar grație întrunirii unor factori favorabili ele au fost foarte bine puse la punct, oferind soluții implicit pentru descifrarea secvenței ARN.

În scopul determinării structurii primare a macromoleculelor de ADN s-au elaborat două strategii, una pe baza reacțiilor chimice, cealaltă având la bază reacții enzimatice. Prima metodă chimică a fost cea preconizată de Maxam și Gilbert (1977), iar prima metodă enzimatică — de către Sanger și colab. (1977); datorită perfecționării vectorilor adecvați, care simplifică mult operațiile — permițând clonarea și secvențializarea ADN într-un singur sistem — metodele enzimatice capătă din ce în ce mai mult teren, deși uneori este destul de greu de făcut o separare netă a celor două aspecte.

7.1.1. Metoda Maxam și Gilbert (1977) — Metoda se bazează pe reacții chimice, care duc la ruperea ADN la poziții specifice și nu implică copierea ADN *in vitro*. Fragmentele de ADN rezultate prin restricție sunt marcate la capătul 5'-terminal cu ^{32}P, folosindu-se fosfatază alcalină (care taie gruparea fosfat neradioactivă) și poli-nucleotidkinază (care introduce gruparea ^{32}P-fosfat din γ-[^{32}P-ATP]). În continuare, segmentele respective sunt supuse unei fragmentări specifice parțiale, ceea ce duce la obținerea unui set de fragmente, cu dimensiuni variind între ele printr-un singur nucleotid, permițând stabilirea exactă a succesiunii bazelor, după separarea lor electroforetică în gel de poliacrilamidă. Scindarea specifică se face astfel;

- *scindarea la guanină și adenină (G>A)*: dimetilsulfatul duce la metilarea guaninei la N_7 și a adeninei la N_3, ceea ce provoacă instabilitatea legăturii glicozidice, care se rupe ușor la încălzire; deoarece metilarea guaninei este mai rapidă decât cea a adeninei și ruperea va fi la fel. La electroforeză și autoradiografie se vor înregistra benzi intense corespunzătoare G și mai slabe pentru A;

- *scindarea la adenină (A>G)*: dacă hidroliza produselor metilate se face cu acizi diluați, ruperea are loc preferențial la adenină, așa încât pe autoradiografie se vor înregistra benzi intense de A și slabe de G;

- *scindarea la citozină și timină (C + T)*: specificitatea scindării se realizează după tratarea cu hidrazină, care duce la formarea de ribozilureе, iar apoi de hidrazonă. Ulterior scindării cu piperidină, analiza electroforetică și autoradiografia relevă benzi de intensitate egală pentru cele două baze pirimidinice;

- *scindarea la citozină (C)*: reacția timinei cu hidrazina este suprimată de prezența NaCl 2M, astfel încât rămâne doar reacția citozinei, care — prin comparație cu reacția anterioară *(C+T)* — permite, prin eliminare, stabilirea pozițiilor corespunzătoare timinei. Schema generală de lucru este prezentată în fig. 31.

De exemplu, pentru un fragment de 10 baze, metoda este redată grafic în figura 32.

În metoda Maxam și Gilbert modificată, pentru eliminarea unor ambiguități care apar la citirea secvenței, se recomandă purificarea prin electroforeză în poliacrilamidă cu uree a ADN marcat cu ^{32}P în poziția 5'. ADN se izolează din gel cu acetat de sodiu 0,1M și precipitare cu alcool etilic. Apoi se realizează următoarele reacții de clivare:

- *reacția G+A*: se face prin hidroliza ADN cu formiat de piperidină, o oră la 37^0C;

- *reacția A>C* are loc cu NaOH 1,2 M, timp de 45 min, la 90^0C, cu hidroliză preferențială la adenină și slabă la citozină;

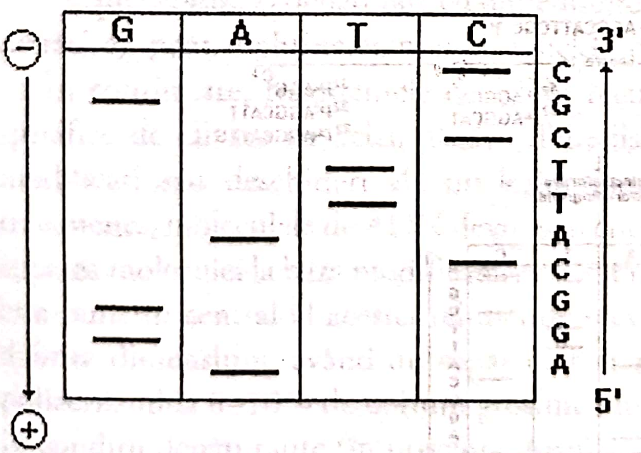


Fig. 31 — Schema generală a metodei Maxam și Gilbert.

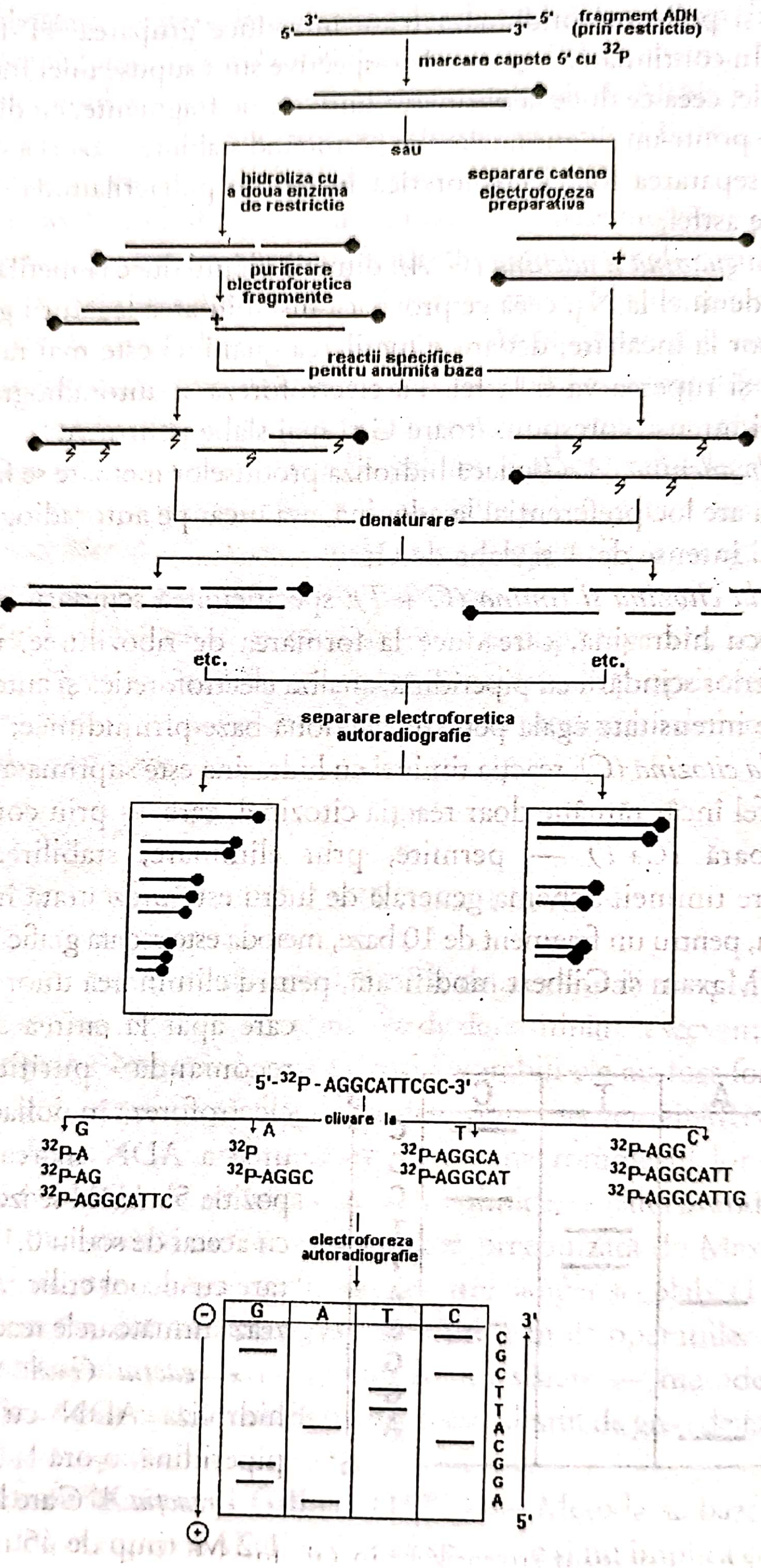

3'
5'
5'
3'
fragment ADN (prin restrictie)
marcare capete 5' cu ^{32}P
sau
hidroliza cu a doua enzima de restrictie
separare catene electroforeza preparativa
purificare electroforetica fragmente
+
+
reactii specifice pentru anumita baza
denaturare
etc.
etc.
separare electroforetica autoradiografie
5'-^{32}P-AGGCATTCGC-3'
clivare la
G
A
T
C
^{32}P-A
^{32}P-AG
^{32}P-AGGCATTC
^{32}P
^{32}P-AGGC
^{32}P-AGGCA
^{32}P-AGGCAT
^{32}P-AGG
^{32}P-AGGCATT
^{32}P-AGGCATTG
electroforeza autoradiografie
⊖
G
A
T
C
3'
C
G
C
T
T
A
C
G
G
A
5'
⊕

Fig. 32 — Secvențializarea unui fragment ADN conform metodei Maxam și Gilbert.

- *reacția G*: în condiții speciale, după metilarea cu dimetilsulfat, scindareaADN are loc exclusiv la G;
- *reacția C+T*: ca și anterior, prin tratare cu hidrazină și scindare cu piperidină;
- *reacția C*: în prezența NaCl, hidrazina reacționează cu C;
- *reacția T*: se realizează cu piperidină, timp de 45min la 20^{0}C.

În general, metodele de clonare, izolare și purificare a ADN permit obținerea unor cantități relativ mari de ADN plasmidial recombinat. Pentru secvențializare se pot folosi 5–7µg de produs ultrapur, din care ARN a fost total eliminat, pentru evitarea supra-aprecierii cantității de acid nucleic de secvențializat. Urmează apoi digestia ADN și purificarea insertului, care poate fi apreciată prin electroforeză.

În funcție de natura capetelor generate de digestia cu endonucleaze se pot utiliza diverse sisteme de marcare, îmbunătățite prin folosirea unor nucleotide marcate specific, la extensia 3' a unor fragmente de ADN tăiate cu *Pst* I (cu ^{32}P-dCTP).

Capetele rezultate la restricție pot fi tocite sau coezive. Dacă se obțin capete de tipuri diferite și dacă pentru marcare se utilizează un singur tip de reacție (pentru marcare 5' sau 3'), ADN marcat se poate secvențializa direct. Dacă cele două capete sunt identice sau dacă se utilizează ambele tipuri de marcare (5' și 3'), se cere separarea lor, deoarece nu se poate face citirea concomitentă a secvențelor de la ambele capete.

Pentru separarea capetelor marcate se pot folosi două metode:

- digestia cu o altă enzimă de restricție a fragmentelor de ADN purificat și marcat; pentru a evita defosforilarea incidentală a capetelor se recomandă să se lucreze în prezența PO_4^{3-} 1mM; urmează separarea fragmentelor pe agaroză sau pe poliacrilamidă și recuperarea lor;
- se procedează la denaturare cu dimetilsulfoxid (timp de 2 min la 90^{0}C, urmată de răcire), pentru obținerea monocatenelor, care apoi se separă electroforetic.

În continuare, fragmentele de ADN recuperate din gel se supun reacțiilor specifice de clivare cu acizi, alcalii, dimetilsulfat, hidrazină, care pot duce la modificări sau deschideri ale nucleelor bazelor din ADN. În urma acestor tratamente, moleculele de ADN devin susceptibile la piperidină, care desăvârșește ruperea moleculei la baza modificată. Această rupere limitată a moleculei de ADN este punctul central al acestei tehnici de secvențializare. Se obțin fragmente de diferite dimensiuni, având un capăt marcat și care pot fi separate pe geluri de poliacrilamidă 8–10% de 0,4mm grosime sau de 20%, cu o grosime de 0,2mm, în condiții denaturante (în prezența ureei).

Reacțiile care au loc sunt sumarizate în tabelul 8.

Tabelul 8 — Reactivii folosiți în secvențializare

	G	G+A	A>C	C+T	C
tampon	*p*H 8	-	-	-	-
apă	-	+	-	+	+
săruri concentrate	-	-	-	-	+
NaOH	-	-	+	-	-
DMS	+	-	-	-	-
acid formic (AF)	-	+	-	+	-
hidrazină (HA)	-	-	-	+	+
temperatură	20⁰C	20⁰C	90⁰C	20⁰C	20⁰C
reacții	- eliminare DMS - pp ADN	- eliminare AF - liofilizare	- neutralizare - pp ADN	- eliminare HA - pp ADN	- eliminare HA - pp ADN
piperidină	+	+	+	+	+

- pentru toate reacțiile: încălzire la 90⁰C, liofilizare, reluare în formamidă 80% deionizată, încărcare gel

7.1.2. Metoda Sanger și Coulson — Cronologic, este anterioară metodei Maxam și Gilbert, și a cunoscut o foarte largă răspândire. Metoda prezintă două variante, principial asemănătoare, bazându-se pe utilizarea unor enzime:

- ***varianta „minus“*** — se face sinteza catenei complementare, marcată radioactiv, pe matrița ADN monocatenar a cărui secvență se determină. Sinteza nefiind sincronizată, se obține un amestec de fragmente de lungimi diferite, al căror capăt 3' — corespunzător *primer*ului — este identic. După îndepărtarea dNTP nereacționați, se continuă incubarea produselor anterioare de sinteză cu ADN polimerază I, în patru seturi de reacție, din fiecare fiind absent câte unul dintre cei patru dNTP utilizați în reacție. Sinteza continuă până în momentul în care ar trebui înglobat nucleotidul lipsă. În final, rezultă patru seturi de oligodeoxiribonucleotide, care diferă între ele printr-un singur nucleotid. Catenele nou sintetizate se desprind de pe matriță prin denaturare, iar apoi sunt analizate prin electroforeză pe gel denaturant, de poliacrilamidă cu uree 8M; se face autoradiografia și se citește secvența ca și în cazul metodei Maxam și Gilbert.

- ***varianta „plus“*** — utilizează proprietatea exonucleazică a ADN polimerazei T4, care constă în degradarea ADN bicatenar începând de la capătul 3’ al oligodeoxiribonucleotidelor sintetizate în prima etapă ca la ***varianta „minus“***. Hidroliza se oprește în dreptul nucleotidului prezent în amestecul de reacție ca dNTP. Și în acest caz se fac electroforeza ți autoradiografia, dar la citire poziția unui anumit nucleotid este indicată de o bandă situată cu un nucleotid mai sus decât ar corespunde în ***varianta „minus“***.

Să considerăm o secvență oligonucleotidică de descifrat prin metoda Sanger și Coulson în ambele variante (fig. 33):

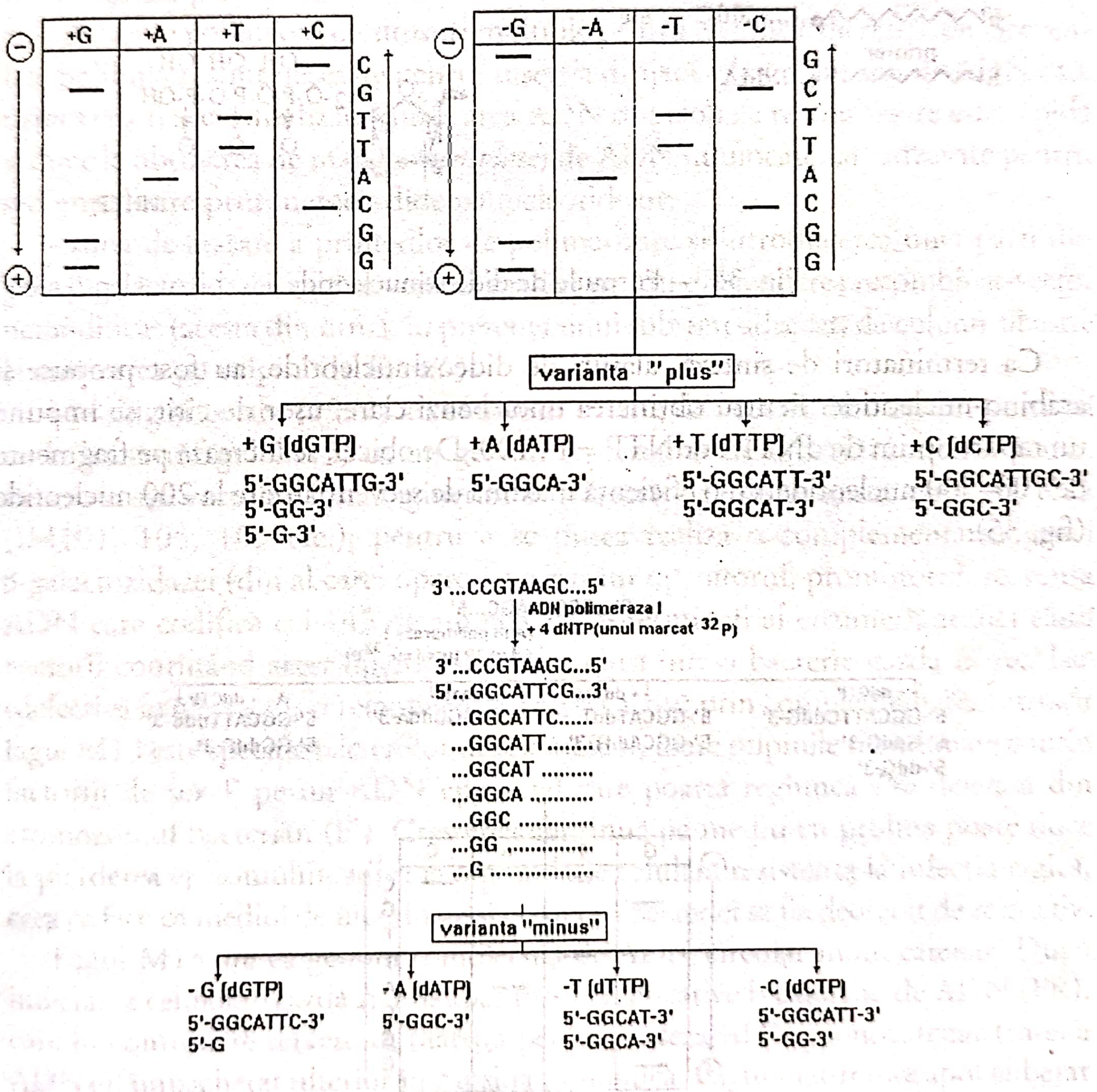

+G
+A
+T
+C
C G T T A C G G
-G
-A
-T
-C
G C T T A C G G
varianta "plus"
+ G (dGTP)
5'-GGCATTG-3'
5'-GG-3'
5'-G-3'
+ A (dATP)
5'-GGCA-3'
+ T (dTTP)
5'-GGCATT-3'
5'-GGCAT-3'
+ C (dCTP)
5'-GGCATTGC-3'
5'-GGC-3'
3'...CCGTAAGC...5'
ADN polimeraza I
+ 4 dNTP(unul marcat 32P)
3'...CCGTAAGC...5'
5'...GGCATTCG...3'
...GGCATTC......
...GGCATT........
...GGCAT ....
...GGCA ....
...GGC ....
...GG ....
...G ....
varianta "minus"
- G (dGTP)
5'-GGCATTC-3'
5'-G
- A (dATP)
5'-GGC-3'
-T (dTTP)
5'-GGCAT-3'
5'-GGCA-3'
-C (dCTP)
5'-GGCATT-3'
5'-GG-3'

Fig. 33 — Schema generală a metodei Sanger și Coulson, cu variantele „plus“ și „minus“.

7.1.3. Metoda dideoxinucleotidelor sau metoda Sanger, Nicklen și Coulson

-Metoda folosește dideoxinucleozidtrifosfați ca terminatori de lanț. ADN de secvențializat, cu rol de matriță, se incubează cu un *primer* și cu ADN polimerază I în prezența dNTP, a unui ddNTP și a ^{32}P. Rezultă un amestec de fragmente, toate având același capăt 5' și resturi de ddNTP la capătul 3', deoarece ddNTP nu are gruparea 3'-OH care să permită continuarea lanțului (fig. 34):

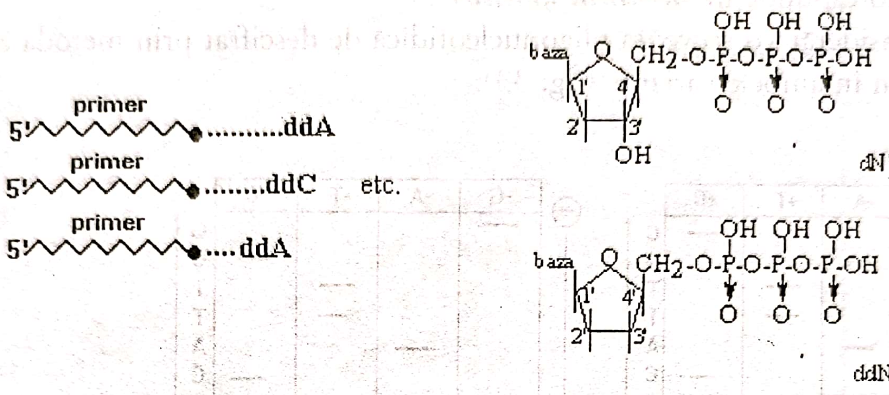

primer
5'
.........ddA
primer
5'
........ddC
etc.
primer
5'
....ddA
OH OH OH
baza
CH2-O-P-O-P-O-P-OH
O O O
1' 4'
2' 3'
OH
dNTP
OH OH OH
baza
CH2-O-P-O-P-O-P-OH
O O O
1' 4'
2' 3'
ddNTP

Fig. 34 — Formule de dideoxinucleotide.

Ca terminatori de sinteză, alături de dideoxinucleotide, au fost propuse și arabino-nucleotide. Pentru obținerea unor benzi clare, ușor de citit, se impune un raport optim de dNTP : ddNTP = 1 : 100. De obicei, se lucrează pe fragmente de 100–500 nucleotide, cu o eficiență maximă de secvențializare la 200 nucleotide (fig. 35):

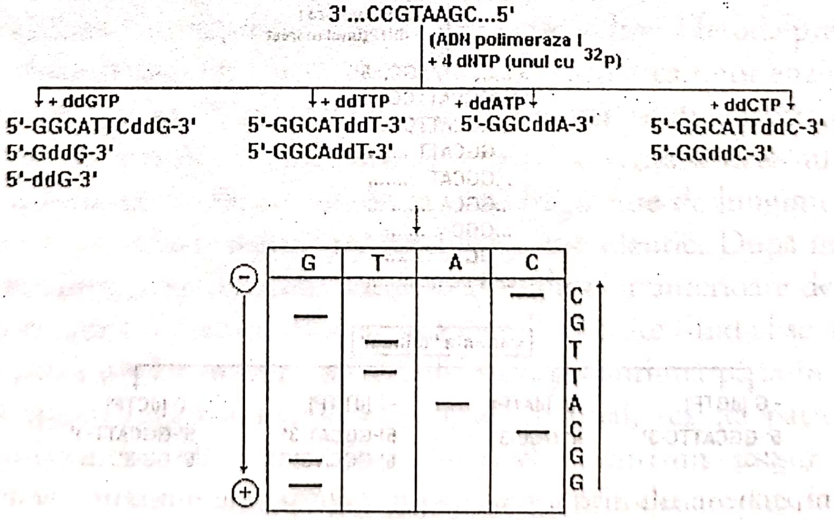

3'...CCGTAAGC...5'
(ADN polimeraza I
+ 4 dNTP (unul cu 32P)
+ ddGTP
+ ddTTP
+ ddATP
+ ddCTP
5'-GGCATTCddG-3'
5'-GddG-3'
5'-ddG-3'
5'-GGCATddT-3'
5'-GGCAddT-3'
5'-GGCddA-3'
5'-GGCATTddC-3'
5'-GGddC-3'
G
T
A
C
−
+
C
G
T
T
A
C
G
G

Fig. 35 — Schema generală a metodei dideoxinucleotidelor.

7.1.4. Alte metode — S-au propus și alte variante ale acestor metode, între care cea a fosfotioaților (Gish și Eckstein, 1988), alți analogi ai nucleotidelor naturale. Încorporarea se face prin patru reacții enzimatice diferite, cu trei dNTP și un fosfo-tioattrifosfat (α-tiotrifosfat). Scindarea catenelor se face prin alchilare, care dă produse ușor hidrolizabile.

Metoda Gish și Eckstein este similară metodei dideoxinucleotidelor, cu singura deosebire că polimerizarea se poate realiza și independent de reacția de secvențializare.

În vederea simplificării clonării, exprimării și analizei fragmentelor de ADN, au fost construiți vectori multifuncționali de clonare, a căror moleculă conține trei elemente principale:

- secvențe polilinkeri cu situsuri multiple pentru enzimele de restricție. Secvențele polilinkeri sunt necesare pentru inserția dirijată a fragmentului de ADN care urmează a fi secvențializat. Purificarea ADN din clonele recombinate este rapidă și duce la obținerea de matrițe (*template*) de ADN monocatenar, adecvate pentru secvențializare prin metoda dideoxinucleotidelor;
- zona de atașare a primerilor de polimerizare și introducerea unei părți din gena β-galactozidazei, care servește ca marker pentru diferențierea recombinat-vector nemodificat (acesta din urmă, în prezența unui substrat adecvat, dă colonii albastre la cultivarea pe tulpini de *E. coli*).

Messing și colab. (1977) au construit o serie de vectori de clonare, pornind de la bacteriofagul M13, cu un genom reprezentat de un ADN monocatenar. Pentru acești vectori a fost „inginerizată“ și o serie de tulpini-gazdă de *E. coli* K12 (JM101, 105, 107 etc.), pentru a se putea realiza α-complementarea genei β-galactozidazei (din al cărei operon s-a reținut operatorul, promotorul, secvența ADN care codifică cei 145 de aminoacizi N-terminali ai enzimei); atunci când vectorii conținând acest operon sunt introduși într-o bacterie-gazdă *E. coli* lac$^-$ (defectivă în gena *gal*), ei refac β-galactozidaza activă prin complementare. Întrucât fagul M13 este specific bacteriilor de sex mascul, toate tulpinile menționate conțin factorul de sex F pe un ADN epizomal care poartă regiunea *Pro* deletată din cromozomul bacterian (F’). Creșterea continuă pe mediu cu prolină poate duce la pierderea epizomului, adică la o populație celulară rezistentă la infecția fagică, ceea ce face ca mediul de menținere și creștere a bacteriei să fie deosebit de restrictiv.

Fagul M13 are ca genom o moleculă de ADN circular monocatenar. După infectarea celulelor-gazdă *E. coli* apar forme replicative bicatenare de ADN (FR), care în continuare servesc ca matriță pentru sinteza ADN monocatenar (catena ADN+), împachetat ulterior în capsida proteinică. Fagul matur este apoi eliberat în mediu. Molecula FR bicatenară a fost supusă unor modificări, ceea ce a dus la construirea vectorilor M13mp8 și respectiv M13mp9, M13mp10/M13mp11, M13mp18/M13mp19. În aceste perechi, clonarea fragmentului de ADN se poate face în ambele orientări, situsurile implicate având aranjare inversă, ceea ce permite determinarea secvenței de la ambele capete, utilizând un singur *primer* (amorsă) de secvențializare. Deoarece fragmentele de ADN se clonează într-o singură zonă a ADN M13mp, s-au sintetizat chimic *primer*i universali, precum și primeri de secvențializare inversă, care se ordonează (*anneal*) numai cu catena (-) a vectorilor M13mp și permit citirea inversă a unui fragment de ADN.

Celulele bacteriene pentru vectorii M13mp se cultivă întâi ca preinocul, apoi în cantitate mai mare la o anumită densitate, se inoculează cu vectorul dorit, se incubează și apoi se izolează ADN M13mp FR, la fel ca și ADN plasmidial. Din circa 1 litru de cultură se pot obține 200–500μg ADN FR. În continuare, se face restricția cu enzimele adecvate, de preferință diferite, pentru inducerea unei orientări forțate de existența unor capete coezive identice și la secvența de analizat. De obicei, fragmentul-pasager va avea cel mult 500 pb, deși din punct de vedere al vectorului M13 se poate ajunge chiar la 3000 pb. Urmează ligarea, optimă la un raport insert:vector = 1:1/2:1. Cel mai adesea se lucrează cu circa 10 ng vector. Se face în continuare transformarea celulelor competente pe mediu cu substrat corespunzător (X-gal, adică 5–bromo-4–cloro-3–indolil-β-**D**-galacto-piranozid și IPTG, adică izopropil-β-**D**-galactopiranozid) și alegerea clonelor albe, recombinate.

ADN M13 ca atare permite, de asemenea, construirea unor sonde de hibridizare. În acest scop, s-a făcut designul unor plasmide multifuncționale, cum ar fi *p*TZ18R/19R, care pot fi replicate ca ADN monocatenar. Acești vectori permit clonarea, secvențializarea, mutageneza *in vitro* și transcrierea *in vitro*, folosind unul și același sistem. Având dimensiuni mici (2500–2900 pb), acești vectori conțin *ori* pBR322 și *ori* f1, pentru generarea ADN mono- sau bicatenari, gena *lacZ'* în care se află inserat MCS (*multiple cloning site* — situs de clonare multiplă) de la plasmida *p*UC18/19, precum și un promotor de la fagul T7, în gena *lac* și în apropiere de MCS (fig. 36).

Și în acest caz, selecția se face cu ajutorul X-gal și IPTG. După transformarea gazdei *E. coli* JM103, plasmidele pot fi izolate ca ADN dublu catenar, pentru clonare sau pentru transcrierea *in vitro* cu ajutorul ARN polimerazei T7

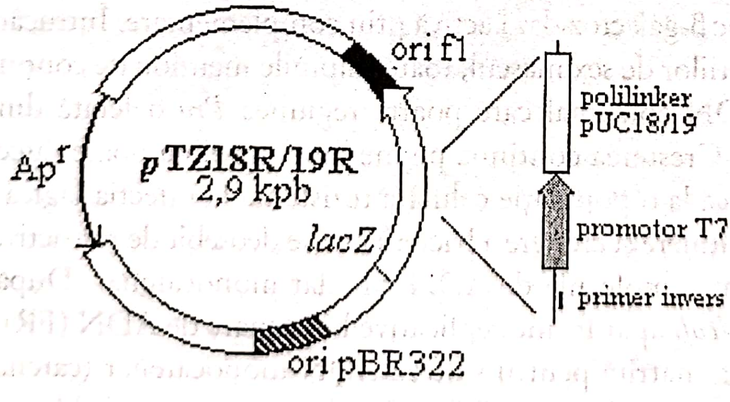


Fig. 36 — Plasmida *p*TZ18P/19R — vector de secvențializare.

ultrapure. Când celulele transformate cu *p*TZ monocatenar vor fi suprainfectate cu fagul helper M13K07 se va produce *p*TZ monocatenar, care va fi secretat în afara celulei. Acest ADN *p*TZ poate fi izolat în cantități mari și folosit pentru mutageneză țintită sau pentru secvențializare cu dideoxinucleotide, folosind primeri pentru revers-secvențializare.

Primerii se aleg în funcție de situsul de clonare.

În cazul lucrului cu vectori tip M13, secvențializarea se face practic prin metoda dideoxinucleotidelor, dar pentru a ajunge acolo se pot folosi diverse variante, cum ar fi următoarea:

- fragmentul de analizat poate fi clonat în vectori de tip M13. ADN recombinant se extrage, iar fragmentul inserat servește apoi ca matriță pentru secvențializarea cu dideoxinucleotide. Dacă se lucrează cu *p*BR322, după liniarizare ADN trebuie întâi denaturat termic sau, cu rezultate mai bune, alcalin. Sinteza ADN complementar se realizează în patru serii separate, fiecare conținând dNTP, unul marcat cu ^{32}P, plus un ddNTP sau cele prezentate în fig. 37 și 38.

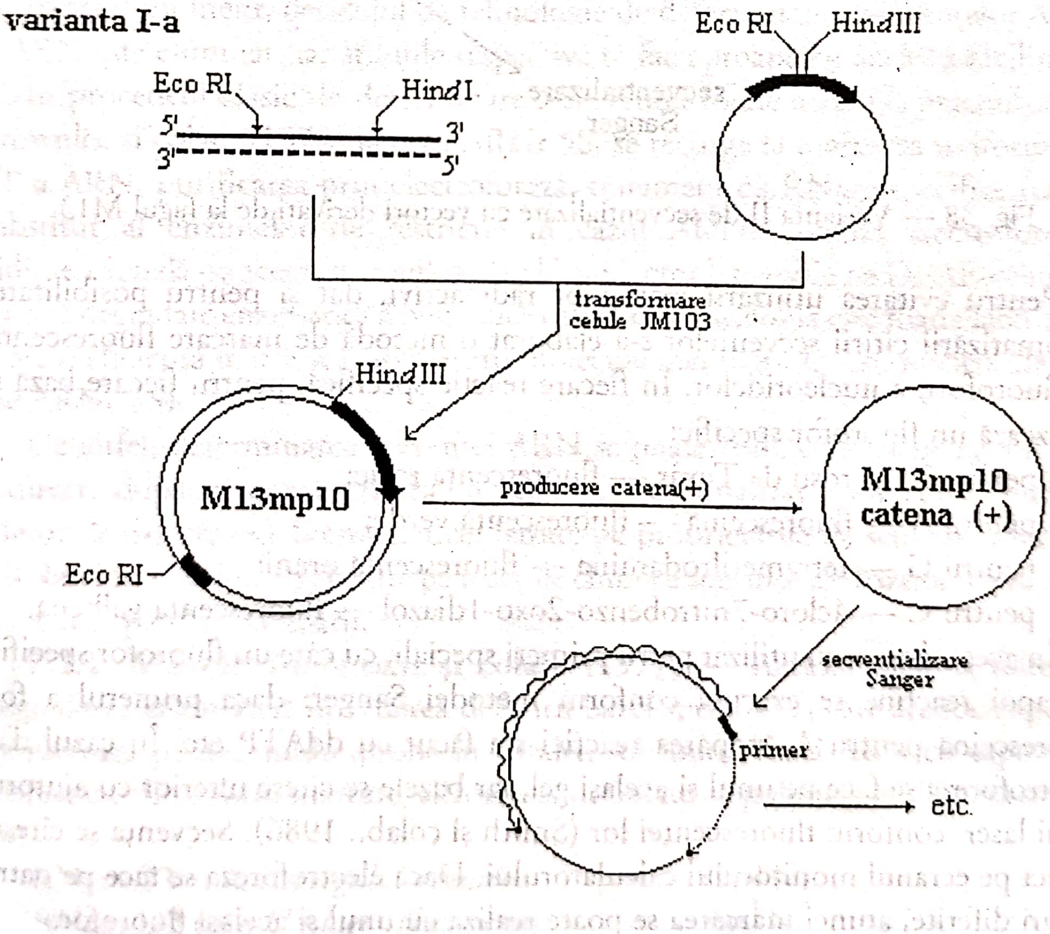

varianta I-a
Eco RI
HindIII
Eco RI
HindI
5'
3'
3'
5'
transformare
celule JM103
HindIII
M13mp10
Eco RI
producere catena(+)
M13mp10
catena (+)
secventializare
Sanger
primer
etc.

Fig. 37 — Varianta I de secvențializare cu vectori derivați de la fagul M13.

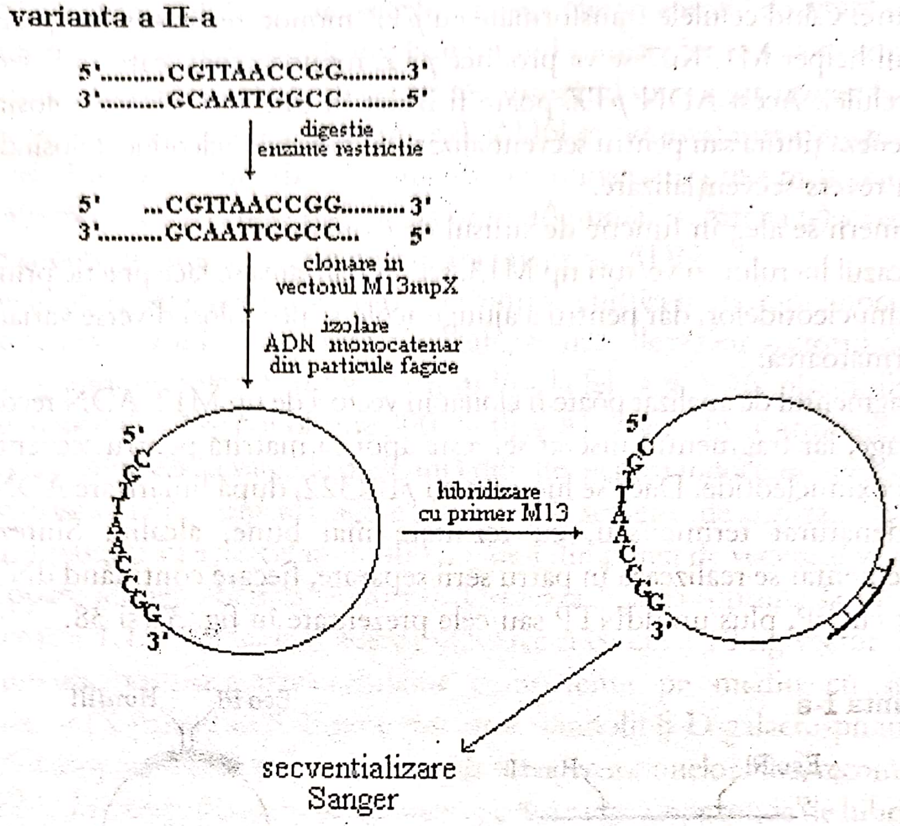

varianta a II-a
5'..........CGTTAACCGG..........3'
3'..........GCAATTGGCC..........5'
digestie
enzime restrictie
5' ...CGTTAACCGG.......... 3'
3'..........GCAATTGGCC... 5'
clonare in
vectorul M13mpX
izolare
ADN monocatenar
din particule fagice
5'
CCGTTAACCGG
3'
hibridizare
cu primer M13
5'
CCGTTAACCGG
3'
secventializare
Sanger

Fig. 38 — Varianta II de secvențializare cu vectori derivați de la fagul M13.

Pentru evitarea utilizării izotopilor radioactivi, dar și pentru posibilitatea automatizării citirii secvențelor s-a elaborat o metodă de marcare fluorescentă, cu fluorofori, a nucleotidelor. În fiecare reacție specifică, pentru fiecare bază se utilizează un fluorofor specific:

- pentru T — roșu de Texas — fluorescență roșie;
- pentru A — fluoresceină — fluorescență verde;
- pentru G — tetrametilrodamină — fluorescență oranj;
- pentru C — 4cloro-7nitrobenzo-2oxo-1diazol — fluorescență galbenă.

În acest scop, s-au utilizat patru primeri speciali, cu câte un fluorofor specific, iar apoi reacțiile se execută conform metodei Sanger: dacă primerul a fost fluoresceină pentru A, stoparea reacției s-a făcut cu ddATP etc. În cazul dat, electroforeza se face pe unul și același gel, iar bazele se citesc ulterior cu ajutorul unui laser, conform fluorescenței lor (Smith și colab., 1986). Secvența se citește direct pe ecranul monitorului calculatorului. Dacă electroforeza se face pe patru geluri diferite, atunci marcarea se poate realiza cu unul și același fluorofor.

7.2. SECVENȚIALIZAREA ARN

În perioada anilor 1980, studiile referitoare la determinarea secvenței ARN erau mult mai avansate decât cele privind aceeași analiză la nivelul ADN. La bază au stat metodele convenționale, bazate — așa cum s-a menționat deja — pe scindarea enzimatică specifică a moleculei ARN, urmată de separarea cromatografică a segmentelor. Posibilitatea de analiză electroforetică pe poliacrilamidă a oligonucleotidelor astfel obținute, a ușurat atât separarea, cât și identificarea lor. O culme a acestui tip de studii l-a constituit descifrarea de către grupul lui Fiers (1972) a secvenței nucleotidice a genei pentru proteina de înveliș a bacteriofagului MS2.

Totuși, metodele — oricât de perfecționate pentru vremea lor — ale lui Holley și colab. (1965) sau Fiers și colab. (1972), nu au permis rezolvarea determinării secvențelor unor ARN înalt polimerizați, cum ar fi cei ribozomali 16/18S și 23/28S. Cu tot handicapul de 10 ani, cursa secvențializării au câștigat-o tehnicile pentru secvențierea ADN. Abia apoi, pe modelul oferit, s-a reușit descifrarea completă a secvențelor ARNr (Carbon și colab. 1979).

În acest moment, decalajul de tehnologie de determinare a secvențelor ADN și ARN este eliminat, iar studiile respective se fac aproape cu aceleași facilități.

În procedeul clasic de determinare a secvenței totale a ARN, preconizat de Brownlee și colab. (1972) pentru ARNr 5S, se recurge la marcarea uniformă cu ^{32}P a ARN, purificarea prin electroforeză, tratament cu RNaze specifice (ca un substitut al enzimelor de restricție în cazul ADN), analiza electroforetică bidimensională pe acetat de celuloză la *p*H acid, cromatografie pe DEAE-celuloză, o nouă degradare enzimatică a oligonucleotidelor etc. Metoda este foarte laborioasă și are o eficiență foarte scăzută pentru molecule mai mari de 120 nucleotide (cât are ARNr 5S).

De altfel, determinarea secvenței ARN se poate realiza direct pe genom sau indirect, după revestranscrierea în ADNc, secvențializat apoi corespunzător. Metodele directe pot fi enzimatice, bazate pe proprietățile de scindare specifică a RNazelor, sau chimice, bazate pe reacțiile chimice specifice ale bazelor, cu ruperea catenei la locul modificării.

7.2.1. Metoda Simoncsits și colab. (1977) — Această metodă folosește degradarea enzimatică în vederea definirii bazei specifice la care are loc ruperea. Se lucrează pe mai multe probe în paralel, substratul fiind ARN cu capătul 5' marcat cu ^{32}P. Pentru marcare, alicotele sunt tratate cu polinucleotidkinază și apoi cu:

RNaza T1 (din *Aspergillus oryzae*)	Gp↓N;
RNaza U2 (din *Ustilago spherogena*)	Ap↓N;
RNaza PhyM (din *Phaseolus polycephalum*)	Ap↓N;

Up↓N; dau produse
RNaza B (din *Bacillus cereus*) Up↓N; 3'fosforil
Cp↓N;
RNaza CL3 (din ficat de pui) Cp↓N.

Toate reacțiile de hidroliză au loc la $55^{0}C$/12 min, iar amestecul de reacție se încarcă direct pe gelul de separare și citire a secvențelor. În general, enzimele sunt liofilizate și se adaugă la ARN în funcție de activitatea lor, știind că în condițiile amintite — prin definiție — o unitate enzimatică produce digestia parțială a $3\mu g$ ARN.

Dacă marcarea radioactivă se face la capătul 3', utilizând ARN ligază, pentru scindare se poate folosi nucleaza M1 (din *Cucumis melo*) specifică pentru: N↓pA, N↓pU, N↓pG, dând produse cu capăt 5'fosforil.

Pentru clivarea moleculei în zonele ARN dublu catenar se folosește RNaza V1, din veninul de cobra; în acest caz, o unitate enzimatică produce $1\mu g$ de produs acidosolubil, într-un minut, la $37^{0}C$.

RNaza pancreatică, specifică pentru C și U, poate fi și ea folosită.

După hidroliză urmează electroforeza pe poliacrilamidă 20%, în condiții denaturante, și citirea ordinei pe autoradiografie la fel ca și la ADN.

7.2.2. Metoda Peattie (1979) — Aceasta este o metodă adaptată pentru ARN, derivată din metoda Maxam și Gilbert. Și în acest caz, se realizează patru reacții specifice pe alicote, pentru fiecare bază în parte. Modificarea specifică a bazelor ARN este asociată cu ruperea legăturii internucleotidice catalizată de amine, generând fragmente de ARN a căror lungime determină practic poziția fiecărei baze. Dimetilsulfatul modifică G, dietilpirocarbonatul atacă mai ales A, hidrazina este un reactiv specific pentru U și C, iar concentrațiile saline mari inhibă reacția cu U. În acest caz, marcarea ARN se face la capătul 3', iar citirea se face ca la ADN. Astfel, se pot citi 100–200 de nucleotide începând de la capătul marcat. Aplicarea directă a metodei Maxam și Gilbert la ARN nu se poate face din cauza labilității mai mari a legăturilor fosfodiesterice din lanțul poliribonucleotidic. Reacțiile specifice sunt următoarele:

- *scindarea la guanină (G)*: dimetilsulfatul DMS metilează N_7, iar apoi reducerea cu borohidrură de sodiu în mediu de anilină rupe catena în dreptul guanozinei;

- *scindarea la adenină și guanină (A>G)*: în mediu apos dietilpirocarbonatul DEPC carbetoxilează ciclurile imidazolice ale purinelor la N_7, provocând deschiderea lor și implicit, ruperea legăturii internucleotidice. Adenina reacționează mai repede, așa încât benzile specifice A vor fi mai intense;

- *scindarea la uracil (U)*: hidrazina neutră se adiționează la dubla legătură pirimidinică 5,6; în urma hidrazinolizei anilina produce scindarea catenei. Atacul pirimidinelor are loc în ordinea U>C>T;

- scindarea la citozină și uracil (C+U): hidrazina apoasă în prezența NaCl 2–3M nu atacă T, în schimb uniformizează parțial reacția la C și U, care se vor rupe sub acțiunea anilinei;

- scindarea catenei ARN se realizează prin β-eliminare sub acțiunea unor amine primare, în dreptul bazei atacate și alterate.

7.2.3. Metoda Donis-Keller (1979) — Metoda permite determinarea secvenței unor molecule mari de ARN, până la 1200 de nucleotide. Acest lucru a fost posibil prin utilizarea unei strategii ingenioase, constând în următoarele: un hexamer cu o secvență anumită, este hibridizat cu zona monocatenară complementară a unui ARN înalt polimerizat, apoi hibridul este tratat cu RNază H care hidrolizează numai hibrizii ARN-ADN, eliberând astfel fragmente 3'-OH și 5'-fosfat, care se marchează cu ^{32}P fie 3', fie 5'. Aceste fragmente sunt ulterior separate prin metode specifice și în continuare sunt supuse determinării secvenței prin mijloacele deja prezentate (fig. 39).

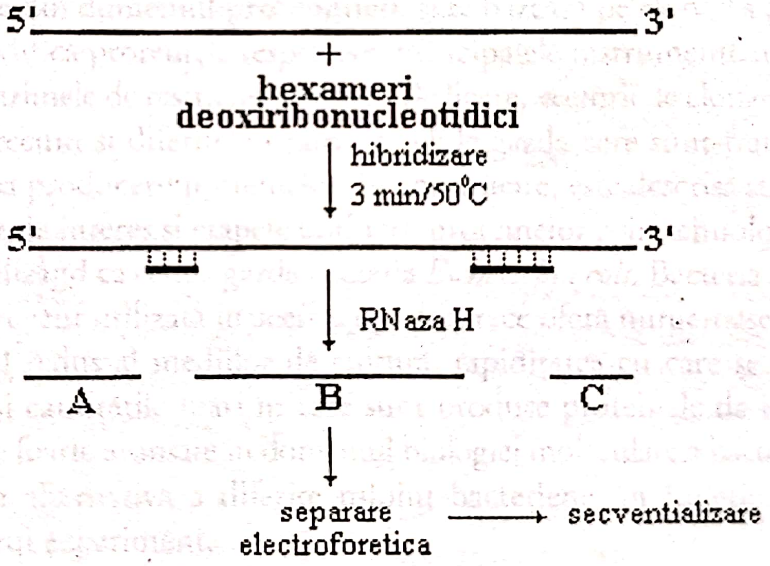


Fig. 39 — Schema generală a metodei Donis-Keller.

De fapt, la ora actuală, secvențializarea moleculelor de ARN nu se mai face direct, ci indirect, lucrându-se pe moleculele de ADNc corespunzătoare, obținute prin reverstranscriere, ceea ce a simplificat mult descifrarea structurii primare a unor molecule cu stabilitate mult mai redusă.

CAPITOLUL II

PRODUCEREA DE PROTEINE PRIN TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT

1. INTRODUCERE

Producerea proteinelor prin tehnologia ADN recombinant este indispensabilă pentru cercetările din domeniul **proteomicii**, și se bazează pe clonarea prealabilă a genelor care codifică proteinele respective. Principalele instrumente utilizate în acest scop sunt enzimele de restricție, enzimele de ligare, vectorii de clonare, vectorii de exprimare, precum și diferitele tipuri de celule gazdă care sunt transformate genetic în vederea producerii proteinelor. În continuare, este descrisă strategia de clonare a genelor de interes și etapele obținerii proteinelor prin tehnologia ADN recombinant, utilizând ca celulă gazdă bacteria *Escherichia coli*. Bacteria *E.coli* este gazda cea mai frecvent utilizată în acest scop, deoarece oferă numeroase avantaje, cum sunt: prețul redus al mediilor de cultură, rapiditatea cu care se realizează expresia genică și cantitățile mari în care sunt produse proteinele de interes. În plus, cunoștințele foarte avansate în domeniul biologiei moleculare a bacteriei *E.coli* permit utilizarea alternativă a diferite tulpini bacteriene, în funcție de particularitățile fiecărui experiment.

2. CLONAREA ȘI EXPRIMAREA UNEI GENE DE INTERES

Vectorii folosiți în tehnologia ADN recombinant derivă din diferite tipuri de plasmide, a căror structură a fost modificată prin metodele ingineriei genetice, și pot fi clasificați în *vectori de clonare* și *vectori de exprimare*. Vectorii de clonare conțin un situs de replicare autonomă în celula bacteriană, o regiune *polilinker* în care există mai multe situsuri unice de restricție, și o genă marker de rezistență la un antibiotic. Vectorii de exprimare (funcționali în celula bacteriană) conțin secvențe suplimentare, reprezentate de: un promotor inductibil, regiunea

ADN ce codifică pentru secvența *Shine-Dalgarno* din molecula de ARNm de tip procariot, precum și o secvență terminator. Promotorul și secvența terminator sunt necesare pentru inițierea și respectiv terminarea transcripției, iar secvența *Shine-Dalgarno* este indispensabilă pentru legarea ARNm de ribozomi și inițierea translației în celula bacteriană (fig. 1).

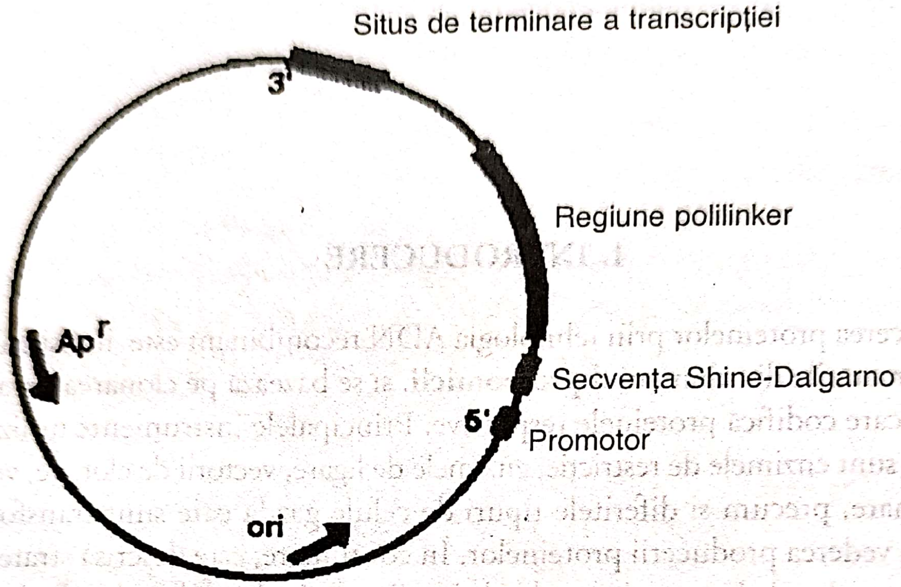


Fig. 1 — Configurația generală a unui vector de exprimare în bacterii.

Regiunea promotor reprezintă locul de legare a enzimei ARN polimeraza;

Secvența *Shine-Dalgarno* permite atașarea moleculei de ARNm la ribozomii bacterieni;

Regiunea *polilinker* conține mai multe situsuri de restricție unice, care permit inserarea moleculei de ADNc;

Situsul de terminare a transcripției servește ca semnal pentru stoparea sintezei moleculei de ARNm;

Ap^r- Gena pentru rezistență la ampicilină;

ori- Originea replicării vectorului în celula bacteriană.

Unul dintre cei mai utilizați vectori moleculari este vectorul *pBluescript* (*SK*+/-), folosit atât ca vector general de clonare, cât și ca vector de exprimare în bacteria *E.coli.* Coloniile bacteriene transformate care conțin acest vector cu insertul plasat în regiunea *polilinker* au culoarea albă, deoarece insertul blochează exprimarea genei lac Z, care codifică β galactozidaza în prezența inductorului IPTG, iar cele care conțin vectorul nemodificat sunt de culoare albastră. Această diferențiere cromatică este cauzată de incapacitatea bacteriilor care conțin vectorul recombinant de a metaboliza *X-Gal*, un analog al galactozei. *X-Gal* este incolor și se acumulează în coloniile care nu-l pot metaboliza, și care vor avea culoarea albă. Coloniile care nu conțin insertul în regiunea polilinker, produc β galactozidaza,care metabolizează *X-Gal*, rezultând un derivat chimic de culoare albastră, ce conferă coloniilor respective aceeași culoare.

Strategia generală de producere a proteinelor prin tehnologia ADN recombinant presupune subclonarea ADN complementar (ADNc) de interes dintr-un vector de clonare într-un vector de exprimare corespunzător, introducerea vectorului recombinant respectiv în celulele bacteriene care vor realiza sinteza proteinei, optimizarea condițiilor necesare expresiei și purificarea proteinei respective. În cazul exprimării genelor de origine eucariotă, trebuie ținut cont de faptul că bacteriile nu au echipamentul molecular adecvat pentru eliminarea intronilor. Din acest motiv, pentru exprimare nu sunt folosite gene eucariote în forma lor genomică, ci echivalentul ADNc al acestora. ADNc de interes se obține prin copierea de către enzima *reverstrascriptază* a unei matrițe corespunzătoare de ARNm matur. În acest scop se utilizează ca primer o secvență poliT, care se atașează de coada poliA a moleculei de ARNm matur. Pornind de la acest primer, reverstranscriptaza sintetizează o catenă complementară de ADNc, care prezintă o buclă la capătul 3', ce servește ca primer pentru sinteza celei de-a doua catene a ADNc. Ulterior, bucla monocatenară este eliminată cu ajutorul nucleazei S1. Întrucât ARNm matur este un produs al procesului de *splicing* (eliminarea secvențelor corespunzătoare intronilor), ADNc rezultat conține doar secvențele codificatoare (exonii).

Pentru producerea proteinei de interes de către bacteria *E. coli*, sunt parcurse următoarele etape:

a) Subclonarea „in frame" a ADNc într-un vector de exprimare

După clonarea ADNc de interes într-un vector de clonare se procedează la subclonarea ADNc într-un vector de exprimare corespunzător, în funcție de modul în care va fi purificată proteina exprimată. Reacția de ligare între ADN al vectorului de exprimare și fragmentul de ADN reprezentat de insert este o etapa relativ dificilă a experimentelor care urmăresc obținerea de proteine prin tehnologia ADN recombinant. Uneori, ligarea se produce de la prima încercare, însă există situații în care se impune repetarea reacției sau modificarea condițiilor de desfășurare a acesteia. Inserția genei de interes într-un vector de exprimare trebuie realizată cu respectarea cadrului de citire (inserție *in frame*); în caz contrar, se obține o altă proteină decât cea dorită. Situația ideală pentru reușita reacției de ligare este atunci când, atât vectorul linearizat cât și insertul, prezintă capete adezive (*sticky ends*) complementare, deoarece ligarea unor fragmente de ADN care prezintă capete netede (*blunt ends*) este mult mai dificilă. Ca principiu, eficiența ligării este direct proporțională cu concentrația moleculelor de ADN, deoarece ligarea este o reacție care presupune ciocniri intermoleculare. Literatura de specialitate sugerează diferite raporturi molare optime între vector și insert, însă doar practica arată care este raportul molar vector/insert ce maximizează eficiența reacției de ligare. În consecință, se recomandă folosirea, în experimente pilot, a diferite raporturi de concentrație (3vector/1insert,1vector/3insert,1vector/ 1insert, etc.) pentru aceeași reacție de ligare, în vederea optimizării.

Un alt aspect important al strategiei experimentale este selecția coloniilor de bacterii care conțin vectorul recombinant. Vectorii de exprimare conțin o genă marker de rezistență la un antibiotic, de obicei la ampicilină, ceea ce permite selecția coloniilor. Rezistența bacteriilor la acțiunea antibioticului respectiv, nu implică în mod obligatoriu faptul că acestea conțin constructul ADN de interes. În cazul în care atât vectorul cât și insertul au fost restrictate cu o singură enzimă de restricție, ligarea va produce diferite combinații între fragmentele de ADN participante la reacție. În consecință, amestecul de ligare va conține mai multe specii moleculare de ADN recombinant, printre care: vectorul religat, concatemeri ai vectorului, concatemeri ai insertului, vectorul conținând insertul orientat invers, precum și vectorul conținând insertul orientat corect. Cu excepția concatemerilor insertului, toate celelalte specii moleculare conferă rezistență la antibioticul respectiv. Având în vedere faptul că doar coloniile transformate cu vectorul care conține insertul orientat corect prezintă interes, acestea trebuie detectate, prin analiza *pattern*-ului de restricție. Aceasta este realizată prin efectuarea unui **miniprep plasmidial**, restrictarea ADN plasmidial cu enzime de restricție adecvate, și analiza prin electroforeză în gel de agaroză a fragmentelor rezultată.

Dacă vectorul și insertul sunt clivați fiecare cu câte două restrictaze diferite, însă aceleași și pentru vector și pentru insert, se elimină posibilitatea de a obține molecule hibride în care insertul este poziționat greșit.

b) Transformarea unei tulpini bacteriene competente cu vectorul de exprimare recombinant

Transformarea bacteriilor se poate obține prin metoda șocului termic (metoda *Hanahan*), sau prin electroporare. Transformarea genetică prin electroporare dă rezultate mai bune și se poate realiza cu cantități minime de ADN reprezentând vectorul recombinant de interes.

c) Însămânțarea bacteriilor pe plăci cu mediu solid, care conține antibioticul adecvat

Această etapă permite selecția clonelor rezistente la acțiunea antibioticului din mediu. Doar bacteriile transformate cu un construct care conține gena de rezistență la ampicilină, precum și descendenții acestora, vor supraviețui în mediul care conține antibioticul respectiv.

d) Identificarea coloniilor care conțin vectorul recombinant

Se realizează prin analiza *pattern*-ului de restricție a plasmidelor izolate prin metoda miniprep din coloniile care manifestă rezistență la antibioticul din mediul de cultură.

e) Inducerea și optimizarea expresiei proteinice

După obținerea moleculei de ADN recombinant dorite și transformarea cu aceasta a unei tulpini de *E.coli* care poate produce proteina în cantități mari, următoarea etapă este reprezentată de inducerea și optimizarea expresiei proteinice. Pentru aceasta, se efectuează un experiment pilot, care folosește volume mici de cultură bacteriană (2 ml). Variabilele acestui experiment sunt reprezentate de: concentrația de inductor IPTG (*Isopropyl-β-D-thiogalactoside*) utilizată, temperatura la care se realizează inducția și timpul de inducție. În urma analizei pe gel SDS/PAGE a diferitelor lizate bacteriene, sunt evidențiate condițiile optime pentru realizarea expresiei proteinice. Suplimentar, se recomandă folosirea tehnicii *Western blotting*, pentru confirmarea identității proteinei exprimate.

f) Obținerea unor cantități semnificative de proteină

Pentru inocularea animalelor de laborator, în vederea obținerii de anticorpi specifici, este nevoie de cantități suficiente de proteină. Astfel, pentru injectarea unui iepure, necesarul este estimat la 1 mg de proteină pură, ceea ce implică folosirea unor volume mari de mediu de cultură pentru creșterea bacteriilor transformate (400-500 ml). După inducerea transcripției cu IPTG, în condițiile determinate în etapa de optimizare, cultura bacteriană respectivă este supusă centrifugării. Supernatantul se aruncă, iar sedimentul se păstrează la –70°C, până când se trece la etapa purificării proteinei. Purificarea se realizează prin diferite metode, în funcție de particularitățile vectorului de exprimare în care a fost subclonat ADNc de interes.

3. VECTORI DE EXPRIMARE UTILIZAȚI PENTRU PRODUCEREA DE PROTEINE PRIN TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT CU AJUTORUL BACTERIEI *E.COLI*

Producerea de proteine de interes în bacteria *E.coli* se realizează cu ajutorul mai multor tipuri de vectori de exprimare, dintre care cei mai folosiți sunt vectorii din seriile *pGEX*, *pMAL* și *pET*. Utilizarea acestor vectori conduce la producerea de către *E.coli* a unor proteine de fuziune, formate din proteina de interes și o proteină sau o secvența oligopeptidică (codificată de vectorul de exprimare) care are o mare afinitate pentru un anumit ligand, ceea ce permite purificarea proteinei de fuziune prin cromatografie de afinitate. În cazul vectorilor din seria *pGEX*, partenerul de fuziune al proteinei de interes este proteina *GST* (*Glutathione S-transferase*), iar în cazul vectorilor din seria *pMAL* este proteina *MBP* (*maltose-binding protein*). Dezavantajul utilizării acestor vectori constă în faptul că partenerul de fuziune trebuie clivat de proteina de interes, ceea ce reprezintă o etapă suplimentară în economia experimentului.

Vectorii de exprimare din familia *pET* (ex: vectorul *pET20b+*) facilitează obținerea proteinelor de interes în cantități mari, și permit purificarea rapidă și eficientă a proteinelor pe coloană de Ni-agaroză. Această metodă de purificare (pETSystem Manual) dă rezultate foarte bune și se bazează pe sinteza la capătul *amino* sau la capătul *carboxil* al proteinei de interes, a unui fragment oligonucleotidic, alcătuit din șase resturi consecutive de histidină, codificat de vectorul de exprimare. Dacă insertul a fost introdus în vector *in frame*, proteina exprimată va conține cele șase resturi de histidină, care au o mare afinitate față de ionii de nichel ai coloanei de Ni-agaroză. De regulă, secvența polihistidinică nu trebuie eliminată prin clivare, întrucât imunoreactivitatea sa este relativ redusă și, în majoritatea cazurilor, se pare că nu interferă cu utilizarea proteinei de interes pentru obținerea de anticorpi specifici. Proteina de fuziune care conține secvența polihistidinică este purificată dupa următorul protocol:

1. Liza bacteriilor induse cu IPTG să producă proteina de fuziune.
2. Extracția grosieră a proteinei din lizatul bacterian. Se fac mai multe extracții cu soluții tampon diferite. Prin analiza electroforetică SDS/PAGE se identifică fracția în care se află proteina de fuziune.
3. Încărcarea și echilibrarea (cu soluție tampon de legare) a coloanei de Ni-agroză.
4. Trecerea lizatului bacterian (fracția care conține proteina de interes și proteine bacteriene) prin coloana de Ni-agaroză; are loc legarea specifică a cozii polihistidinice a proteinei de fuziune de ionii de nichel, care chelează resturile de histidină.
5. Spălarea coloanei, cu o soluție tampon de spălare, pentru eliminarea impurităților și a proteinelor contaminante.
6. Eluția proteinei de interes, cu un chelator competitiv, reprezentat de imidazol sau EDTA. Pentru optimizarea eluției, se folosesc soluții tampon de eluție cu diferite concentrații ale agentului chelator. Eluția proteinei fuzionate se poate realiza, ca o alternativă la utilizarea agenților chelatori, și cu soluții tampon care au valori descrescătoare ale pH-ului.

4. PROTOCOALE AUXILIARE UTILIZATE ÎN PRODUCEREA DE PROTEINE PRIN TEHNOLOGIA ADN RECOMBINANT CU AJUTORUL BACTERIEI *E.COLI*

4.1 PROTOCOL PENTRU MINIPREP PLASMIDIAL

(adaptat după AUSUBEL et al. și SAMBROOK et al.)

- Se însămânțează colonii bacteriene de interes de pe plăci, în tuburi sterile ce conțin 2 ml mediu lichid 2TY + Amp 100µl/1ml.

- Se incubează peste noapte la 37°C, cu agitare.

- Se recoltează câte 1,5 ml de cultură și se transferă în tuburi *Eppendorf*.

- Se centrifughează 10 minute la microcentrifugă, la turație maximă (15.000 rotații/minut).

- Se elimină supernatantul.

- Se reia (resuspendă) sedimentul în 100 µl GTE, cu ajutorul vortexului.

- Se adaugă 200 µl amestec NaOH/SDS, care se prepară proaspăt din soluția stoc (vezi tabelul I). Se agită tubul, fără vortexare. Se lasă 5 minute la temperatura camerei. Conținutul tubului își schimbă aspectul opac și devine semi-transparent, ceea ce indică liza celulelor bacteriene.

- Se adaugă 150 µl amestec acid acetic/acetat de potasiu și se agită tubul (fără vortex). Se lasă 15 minute la temperatura camerei. Se va forma un precipitat alb, care reprezintă sedimentul proteic și diferite impurități. Se centrifughează tuburile la microcentrifugă, la turație de 12.000 rotații/minut, timp de 15 minute; supernatantul conține ADN plasmidial.

- Se recoltează supernatantul cu pipeta automată și se trece în tuburi Eppendorf noi, care conțin 1 ml etanol 100%.

- Se agită tubul de câteva ori, fără vortexare, apoi se centrifughează la microcentrifugă, la o turație de 12.000 rotații/minut. După centrifugare, se distinge pe fundul tubului un sediment de culoare albă, care reprezintă ADN plasmidial și impurități. Uneori, sedimentul nu poate fi observat cu ochiul liber, ceea ce nu înseamnă neapărat că acesta lipsește. Situația este normală în cazul unor cantități foarte mici de ADN. În acest caz, se lucrează etapele următoare din protocol, apoi se face analiza electroforetică, care relevă prezența sau absența ADN-ului.

- Se elimină supernatantul și se redizolvă sedimentul în 200µl TE (Tris EDTA). Se poate utiliza vortexul; doar plasmidele mai mari de 15 kb limitează utilizarea vortexului.

- Se adaugă 150µl LiCl 5M, se agită tubul și se pune la –20°C, timp de o oră.

- Se centrifughează 5 minute, la microcentrifugă, la turație maximă. Pe fundul tubului se depune un sediment alb, care reprezintă proteine și alte impurități. Supernatantul, care conține ADN plasmidial, se recoltează cu o pipetă automată și se transferă în tuburi *Eppendorf* noi, care conțin 800 µl etanol 100%.

- Se centrifughează 10 minute la microcentrifugă, la o turație de 12.000 rotații/minut. Apare un sediment alb-transparent, care reprezintă ADN plasmidial. În cazul unor cantități mici de ADN, sedimentul este greu de decelat. Se îndepărtează supernatantul.

- Se reia sedimentul în 360µl TE + 40µl Acetat de sodiu 3M. Se adaugă 1ml etanol 100%. Se lasă 10 minute la temperatura camerei, apoi se centrifughează 10 minute la microcentrifugă, la turație maximă. Se observă depunerea unui sediment alb sau semitransparent, care reprezintă ADN plasmidial.

- Se spală sedimentul cu 500µl etanol 80%.

-Se centrifughează 2 minute la microcentrifugă, la o turație de 12.000 rotații/minut. Se îndepărtează supernatantul. Tuburile se lasă cu capacul deschis până la evaporarea etanolului (2-5 minute).

- Se reia sedimentul în 50-100 µl TE, în funcție de scopul pentru care va fi folosit ulterior ADN-ul purificat. Se păstrează la -20°C.

4.2 PROTOCOL PENTRU MEDPREP PLASMIDIAL

(adaptat după AUSUBEL, et al. și SAMBROOK et al.)

Acest protocol se utilizează pentru obținerea de plasmide (vectori) în cantități mari și parcurge următoarele etape:

- Se însămânțează bacterii din coloniile transformate cu plasmida/vectorul de interes în tuburi ce conțin 20 ml mediu lichid 2TY + ampicilină 100 µg/1ml.

- Se incubează peste noapte, la 37°C, cu agitare.

- Se centrifughează 10 minute la centrifuga mare, 12.000 rotații/minut. Se îndepartează supernatantul.

- Se reia sedimentul în 1 ml GTE, cu ajutorul vortexului. Se lasă 5 minute la temperatura camerei.

- Se adaugă 2 ml NaOH/SDS proaspăt preparat din soluția stoc. Se agită fară vortexare. Conținutul tubului devine semitransparent, ceea ce indică liza celulelor bacteriene.

- Se adaugă 1,5 ml amestec acid acetic/acetat de potasiu și se lasă 15 minute la temperatura camerei. Se observă apariția unui sediment alb, care reprezintă proteine și alte impurități.

- Se centrifughează 15 minute la centrifuga mare, 12.000 rotații/minut.

- Se recoltează supernatantul și se transferă în tuburi care conțin 10 ml etanol 100%. Se agită tubul fără vortexare, apoi se centrifughează 15 minute la turație 12.000 rotații/minut, la temperatura camerei.

- Se elimină supernatantul și se dizolvă sedimentul în 300 µl TE. După dizolvare, se recoltează conținutul fiecarui tub și se transferă în tuburi *Eppendorf*. Se adaugă 225 µl LiCl, se agită fără vortex și se păstrează la -20°C, timp de o oră.

- Se centrifughează 5 minute la microcentrifugă, la turație de 12.000 rotații/minut.

- Se recoltează supernatantul și se transferă în tuburi *Eppendorf* noi, apoi se adaugă 5µl RNAza A (10mg/ml). Se incubează la 37°C timp de 30 minute [alternativ: 20µl RNAza A (10mg/ml) + incubare la 37°C, timp de o oră].

- Separarea ADN-ului de proteine cu 255ml fenol + 255ml cloroform/alcool izoamilic (24:1). Se vortexează, apoi se centrifughează la 12.000 rotații/minut. Faza lichidă (superioară) conține ADN.

- Faza superioară se transferă în tuburi noi și se face încă o extracție cu 510µl cloroform/alcool izoamilic (24:1).

- Faza superioară se transferă în tuburi *Eppendorf* noi, apoi se face o dublă precipitare cu etanol 100%.

- Sedimentul se spală cu etanol 80%, după care se lasă tuburile deschise până la evaporarea etanolului.

- Se dizolvă sedimentul în 100µl TE și se păstrează la -20°C.

Tabelul I — Soluții necesare pentru miniprep și medprep plasmidial

Soluții necesare pentru MINIPREP și MIDIPREP	Soluții STOC	Soluții 1X	Necesarul pentru prepararea soluțiilor 1X de volum final=50ml
GTE Glucoza	2M	50 mM	1,25 ml
	Tris pH8	1M	25 mM 1,25 ml
	EDTA pH8	0,5M	10mM 1ml
NaOH/SDS	NaOH 5M	0,2 M	2ml
	SDS 20%	1%	2,5ml
TE	Tris pH8 1M	10mM	0,5ml
	EDTApH8 0,5M	0,2ml	20µl
Acetat de potasiu Acid acetic		3M 2M	14,7g 5,7 ml 100%
LiCl		5M	10,6g

4.3 PROTOCOL PENTRU ELECTROFOREZĂ ANALITICĂ A ADN ÎN GEL DE AGAROZĂ

(adaptat după AUSUBEL et al. și SAMBROOK et al.)

Acest protocol se aplică pentru un volum de 40 ml gel de agaroză și pentru o concentrație a gelului de 0,7% agaroză. Protocolul poate fi adaptat pentru diferite cantități și concentrații de agaroză. Etapele de lucru sunt următoarele:

- Se cântărește agaroză la balanța analitică; necesarul de agaroză pentru prezentul protocol este de 0,28 g de agaroză.
- Se pune agaroză în 40 ml tampon de electroforeză TAE sau TBE 1X, într-un pahar *Erlenmeyer*.
- Se încălzește amestecul până la topirea completă a agarozei. Se folosește cuptorul cu microunde sau becul de gaz.
- Se lasă amestecul să se răcească până când temperatura sa coboară la 40-45°C, apoi se adaugă bromura de etidiu în concentrație finală de 1µg/ml (4 µl). Bromura de etidiu se leagă de moleculele de ADN și, în urma excitării cu radiație UV, permite vizualizarea fragmentelor de ADN sub forma unor benzi portocalii.
- În cazul în care construcția tăviței de electroforeză o cere, tăvița se închide cu bandă adezivă.
- Se montează pieptenul de electroforeză, cu dinții mici în jos.
- Se toarnă gelul în tăviță, mai întâi în dreptul dinților pieptenului, evitându-se formarea de bule de aer.
- Se așteaptă pană la solidificarea gelului. După 15-20 minute, gelul devine opac, semn că poate fi folosit pentru electroforeză. Se scote pieptenul cu atenție, pentru a nu distruge godeurile (cavitățile) formate. Capacitatea godeurilor este de 12-15µl.
- Se montează tăvița în aparatul de electroforeză și se toarnă tampon de electroforeză până când nivelul acestuia depășește foarte puțin nivelul gelului. Se va evita formarea de bule de aer la nivelul godeurilor.
- Aparatul de electroforeză se cuplează la sursa de curent. Polul pozitiv trebuie să fie la capătul opus godeurilor. Moleculele de ADN sunt încărcate negativ datorită resturilor de fosfat, motiv pentru care vor migra spre polul pozitiv. Viteza de migrare a fragmentelor de ADN este invers proporțională cu mărimea lor, astfel încât fragmentele cele mai mici se vor îndepărta cel mai rapid de zona godeurilor.
- În primul godeu se introduce un marker care permite estimarea mărimii fragmentelor de ADN. Se utilizează frecvent ADN de fag λ restrictat cu enzima BstEII. Fragmentele rezultate au o mărime cunoscută, ceea ce permite folosirea lor ca etalon. Se folosesc 2µl de soluție ADN de fag λ de concentrație 75ng/ml, la care se adaugă 2µl soluție tampon de bromfenol+glicerol.

- În godeurile rămase, se introduc pe rând probele care urmează să fie analizate. Se lucrează cu pipeta automată, iar vârfurile pipetei se schimbă pentru fiecare probă. În fiecare godeu se introduc 5 µl de amestec constând în 3 µl probă ADN și 2 µl soluție tampon de bromfenol+glicerol. Bromfenolul are culoare albastră și permite vizualizarea frontului de migrare, evitându-se astfel ieșirea probelor din gel în cazul unei electroforeze prelungite. Glicerolul favorizează depunerea amestecului pe fundul godeurilor.
- Se pornește sursa de curent, lucrându-se la o tensiune de 70-80V și o intensitate a curentului de 45mA.
- Când frontul de migrare ajunge în apropierea capătului opus al gelului, se întrerupe sursa de curent.
- Se scoate tăvița cu gelul și se vizualizează în UV. Se fac fotografii în UV ale gelului.

4.4 PROTOCOL PENTRU ELECTROFOREZĂ PREPARATIVĂ ÎN GEL DE AGAROZĂ, ÎN SCOPUL IZOLĂRII ȘI PURIFICĂRII ADN

(adaptat după AUSUBEL et al. și SAMBROOK et al.)

Acest protocol se folosește pentru separarea și purificarea fragmentelor de ADN rezultate în urma acțiunii enzimelor de restricție. Fragmentele purificate se utilizează ulterior pentru reacția de ligare. Etapele acestui tip de electroforeză sunt aceleași cu cele ale electroforezei de tip analitic, însă apar unele deosebiri. Particularitățile acestui tip de electroforeză sunt:

- Se lucrează cu godeuri mai mari, în care să încapă 20-25µl de amestec, format din produșii reacției de restricție și soluția de bromfenol + glicerol.
- Se lucrează la un voltaj de 50 V și un amperaj de 40 mA.
- Vizualizarea benzilor de ADN se face rapid, folosindu-se o radiație UV cu lungime de undă mare, pentru a se evita mutagenizarea ADN-ului. Eventualele mutații pot afecta capetele moleculelor de ADN, impiedicând astfel realizarea ligării. De asemenea, există riscul inducerii de codoni stop în molecula insertului, ceea ce va conduce la o terminare prematură a translației. Nu se fac fotografii în UV ale gelului.
- Nu este nevoie ca frontul de migrare să ajungă până la capătul gelului. În general, e suficientă o migrare până la jumătatea gelului.

După deconectarea de la sursa de curent, se vizualizează benzile de ADN la o lungime de undă maximă a radiației UV. Folosind o lamă sterilă, se decupează rapid fragmentele de interes din gel, astfel încât acestea să conțină un volum minim de agaroză în jurul benzilor de ADN. Fragmentele obținute se pun în tuburi

Eppendorf, notate corespunzător. Se trece la purificarea imediată a ADN-ului din gelul de agaroză, folosindu-se *kit*-uri speciale. În cazul în care condițiile nu permit purificarea imediată a ADN-ului, tuburile vor fi depozitate temporar la -20°C.

CAPITOLUL III

IZOLAREA ȘI PURIFICAREA ADN

1. INTRODUCERE

Macromolecula ADN este o structură inerta chimic, grupările potențial reactive fiind situate în centrul helixului, unite prin legături de hidrogen. Perechile de baze azotate sunt protejate la exterior de către învelișul fosfoglucidic și consolidate intern prin puternice forțe de stivuire. Cu această structură robustă, ADN rezistă în timp mai mult decât alte componente celulare, el putând fi analizat chiar și atunci când provine din diverse probe biologice (sânge uscat, salivă, păr, oase etc.) precum și din analizarea resturilor biologice din situsuri arheologice sau mumii. Aceeași durabilitate chimică face ca macromolecula ADN să poată fi analizată și după perioade lungi de timp, după ce a fost izolata din probe cu condiția ca ea să fie corect prezervată. Din păcate, ADN este fragil din punct de vedere fizic, fiind vulnerabil la forțe hidrodinamice de tăiere. În soluție structura dublu catenară a ADN prezintă o flexibilitate redusă, datorită forțelor de stivuire dintre perechile de baze purinice și pirimidinice și forțelor electrostatice de respingere dinte grupările fosfat. În timpul desfășurării procedurilor uzuale de izolare ADN, fluxul hidrodinamic rezultat prin pipetate sau agitare generează curenți care au capacitatea de a tăia ambele catene ADN. Astfel, ADN genomic se obține în formă fragmentată, generându-se fragmente cu lungimi care variază de la 100 Kb la 150 Kb. În această formă, ADN îndeplinește toate condițiile pentru a fi utilizat cu succes în analize tip Southern blot, în reacții de amplificare prin polimerizare în lanț și pentru construirea librăriilor de ADN genomic.

Metoda clasică de izolare a ADN implică digestia celulelor eucariote sau a țesuturilor cu proteinază K, în prezența EDTA, care are rolul de a leagă cationii divalenți și de a inhiba DNA-zele. Are loc solubilizarea membranelor și denaturarea proteinelor cu detergenți de tip SDS. Acizii nucleici sunt apoi purificați prin extracții cu solvenți organici, ARN contaminant fiind eliminat prin digestie cu RNA-aze.

Extracția și purificarea acizilor nucleici este o etapa esențială care stă la baza tuturor procedeelor de inginerie genetică și a studiilor de genetică moleculară.

Diversitatea probelor biologice – celule eucariote sau procariote, culturi de celule sau de țesuturi proaspete, țesut de plante sau de animale, etc., determină existența unei varietăți de metode de extracție, cu diferențe în etapele de lucru, în compoziția soluțiilor chimice folosite, molaritatea și pH-ul tampoanelor. Procedeele de izolare a acizilor nucleici diferă și în funcție de scopul urmărit, adică de tipul de acid nucleic pe care îl extragem sau separăm de ceilalți constituenți organici ai probei. Indiferent de metoda de lucru aleasă, se disting câteva etape de lucru comune tuturor procedeelor.

2. LIZA CELULARĂ

Studiile de genetică moleculară implică prezența eșantioanelor de acizi nucleici purificați, fiecare celulă nucleată putând fi utilizată drept sursă de ADN.

Încă de la descoperirea acizilor nucleici, de către Fr. Miescher, în anul 1868, prin analiza puroiului, s-a putut constata că ei pot fi eliberați din celule prin liză celulară.

Astăzi, tehnica extracției de acizi nucleici are ca primă etapă tocmai liza celulelor, care poate fi făcută fie pe cale mecanică (mojarare cu nisip), fizică (ultrasonicare) sau chimică (tratare cu detergenți specifici: SDS, Triton X, Nonidet, Tween și/sau enzime care atacă peretele celular: proteinază K, pronază E, lizozim). În momentul în care o celulă este supusă lizei, crește vulnerabilitatea macromoleculei de ADN datorită nucleazelor endogene eliberate care realizează digestia enzimatică, precum și datorită faptului că filamentul de ADN este „casant". În utilizarea tehnicii de extracție a ADN, trebuie evitată distrugerea enzimatică și mecanică a acestuia. Enzimele utilizate au rolul de a distruge DNA-zele și RNA-zele eliberate prin liza celulelor sau contaminante.

3. DEPROTEINIZAREA

Separarea fazei organice, respectiv înlăturarea prin precipitare a proteinelor și a resturilor celulare, se realizează prin tratamente chimice urmate de centrifugare. Modul standard de înlăturare a proteinelor din soluțiile de acizi nucleici este extracția fenolică. În acest caz, deproteinizarea este eficientă, însă fenolul nu inhibă complet activitatea RNA-zelor, și este solvent pentru moleculele de ARN care conțin cozi lungi poli-A. Depășirea acestor dificultăți se face prin adăugarea unui amestec cloroform-alcool izoamilic care stabilizează faza organică dintre cele două faze lichide.

4. EXTRACȚIA ADN

Principiul metodei îl reprezintă utilizarea solubilității diferențiate a moleculelor (acizi nucleici/contaminanți) între două faze nemiscibile.

Realizare

Soluția de acizi nucleici este viguros amestecată cu o fază non-miscibilă timp de câteva minute. Faza apoasă, care conține acizii nucleici, este recuperată delicat cu pipeta, după centrifugare.

Principalele tipuri de extracții sunt:

1. Extracția fenolică: fenolul este un deproteinizant puternic în care acizii nucleici nu sunt solubili. Calitatea fenolului este foarte importantă. Acesta trebuie să fie perfect pur și neoxidat (distilat) . Extracția fenolică se utilizează de fiecare dată când acizii nucleici trebuie să fie liberi de proteine.
2. Extracția cu cloroform sau eter: acest tip de extracție completează întotdeauna o extracție fenolică și permite îndepărtarea urmelor de fenol care ar putea fi asociate fazei apoase.
3. Extracția cu izobutanol are 2 efecte: extrage moleculele organice cum ar fi bromura de etidiu și concentrează de 10–100 de ori o soluție de acizi nucleici
4. Extracția cu NaCl 6M

Un factor de concentrare superior poate fi obținut multiplicând extracțiile succesive.

5. PRECIPITAREA ADN

Precipitarea cu alcool etilic: trebuie efectuată la o înaltă forță ionică (2,5 volume de etanol de 95^0 la 1 volum eșantion). În aceste condiții, acizii nucleici sunt total precipitați. Pentru concentrațiile scăzute de ADN (<50 µg/ml) timpul de precipitare trebuie să fie foarte lung (> 10 ore). Alcoolul etilic trebuie să fie foarte rece, deoarece precipitările sunt accelerate prin răcire (de la -20^0C la -70^0 C). Precipitatul este recuperat prin centrifugare.

Precipitarea cu izopropanol: are același principiu, însă diferă prin 3 caracteristici:

- nu este necesară sarea;
- precipitarea se face volum la volum;
- fragmentele de ADN mici, chiar la concentrație mare, nu sunt precipitate, ceea ce permite eliminarea lor;

După ambele tipuri de precipitare, precipitatul se spală cu etanol 70%, pentru îndepărtarea sării sau a urmelor de izopropanol, după care se usucă.

ADN obținut este resuspendat într-o soluție tampon TE (Tris 10 mM și EDTA 0,1 la 1 mM) și se poate conserva astfel la 4°C. Concentrația de EDTA poate fi crescută pentru a evita riscul digestiei de către nucleazele contaminante dar, în acest caz, va fi necesară îndepărtarea acesteia înainte de a utiliza ADN, deoarece enzimele sunt inhibate de către EDTA. Preferabil este să nu se congeleze ADN genomic, deoarece congelarea și decongelarea provoacă rupturi mecanice ale ADN.

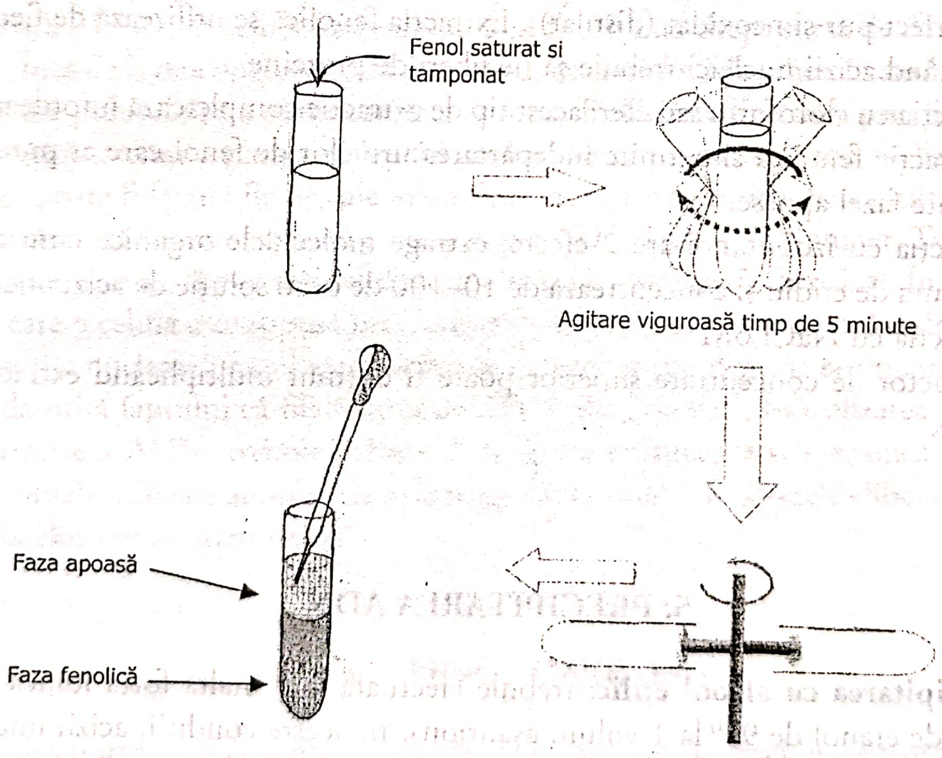


Fig. 1 — Realizarea unei extracții fenolice pentru a elimina proteinele contaminante dintr-o soluție de acizi nucleici (în cazul extracției cu eter sau izobutanol, fazele sunt inversate: apa la fund și eterul deasupra)

6. MATERIALUL BIOLOGIC

6.1. SÂNGE TOTAL

In studiile de genetică moleculară sursa majoră de ADN o reprezintă leucocitele sangvine (acestea reprezintă 1–10% din totalul celulelor sangvine). Pornind de la câțiva mililitri de sânge, prelevat pe anticoaguagulant, (în general EDTA; dar se pot utiliza heparina și citratul) se pot obține câteva sute de micrograme de ADN sub formă de fragmente, cu o talie mai mare de 20 Kb, ceea ce este suficient calitativ și cantitativ pentru studii moleculare. Prezervate în acest fel, eșantioanele de sânge total anticoagulate pot fi trimise prin poștă la temperatura mediului. Este posibil ca apoi să fie congelate la -20^{0}C sau mai bine la –80^{0}C pentru mai multe luni. Unii cercetători preferă să congeleze sedimentul leucocitar, obținut prin centrifugare, mai mult decât sângele total. Este esențial ca toate operațiile să se efectueze steril, și decongelarea să fie făcută chiar înainte de a începe extracția.

6.2. CELULE ÎN CULTURĂ

În cazul când extracția se realizează pornind de la țesuturi (de exemplu vilozități coriale în diagnosticul prenatal) sau celule în cultură (de exemplu amniocite, linii limfoblastoide), celulele trebuie omogenizate în prezența unui detergent cu ajutorul unui aparat Potter. Restul tehnicii este asemănător cu cel pentru sânge total. Evoluția tehnicii permite suprimarea etapei fenolice, proteinele fiind eliminate prin hidroliză enzimatică.

6.3. ȚESUTURI

Extracția ADN este identică și în cazul țesuturilor dure (de exemplu țesut osos) sau moi (țesut hepatic). În acest caz, fragmentele de țesut se scufundă în azot lichid, se congelează, iar apoi se mojarează până la obținerea unei pulberi cât mai fine. Aceasta metodă nu este traumatizantă pentru constituenții celulari, deoarece s-a observat, de exemplu, că polizomii rămân intacți. Pudra rezultată prin mojarare este prelucrată la fel ca pentru celulele aflate în cultură.

7. OBȚINEREA ARN TOTAL

Obținerea ARN este mai dificilă decât a ADN-ului, deoarece este foarte vulnerabil la acțiunea RN-azelor. RN-azele sunt ubiquitare (de exemplu degetele sunt acoperite de RN-aze), extrem de active și foarte rezistente la agresiunile obișnuite care se exercită de obicei asupra tuturor enzimelor; de exemplu, încălzirea la 90 °C nu le modifică activitatea. Lucrul în vederea obținerii ARN se face deci în condiții de maximă sterilizare. Mediul (apa, tampoanele) și instrumentarul trebuie autoclavate, iar obiectele de plastic trebuie tratate cu acid iodoacetic 10 mM, iar apoi clătite cu apă distilată sterilă.

Principiu

Țesuturile sau celulele sunt omogenizate într-un tampon care conține: un detergent puternic concentrat (SDS sau sarcozil), un agent disociant (clorura sau tiocianat de guanidină), o soluție tampon (acetat) și un agent reducător concentrat (2–mercaptoetanol sau DTT). Compoziția acestui tampon a fost astfel aleasă pentru a îndeplini următoarele cerințe: să inhibe RN-azele endogene, să denatureze acizii nucleici și să disocieze proteinele. Debriurile sunt îndepărtate prin centrifugare.

O tehnică foarte bună și cu un randament foarte mare este cea bazată pe precipitarea diferențiată a ARN și ADN între pH și concentrația de etanol. O tehnică mai sofisticată se bazează pe faptul că densitatea ARN este superioară celei a ADN. În această tehnică extractul celular este ultracentrifugat în gradient de clorura de cesium 5,7M, timp de 20 de minute. Doar ARN este capabil să traverseze acest gradient, și este apoi recuperat la fundul tubului sub formă de cristale pure.

Indiferent de tehnica utilizată, ARN este apoi spălat cu acetat de sodiu 3M pH 5 și precipitat cu etanol. ARN-ul poate fi conservat timp de 1 an, fie sub forma precipitată în etanol fie sub formă congelată la –70 °C în apă conținând RN-azina – inhibitor ARN extras din placenta umană.

8. OBȚINEREA ARN POLI A*

Marea majoritate a ARN mesager eucariot conține o coadă poliadenilată, care poate depăși consecutiv 100 resturi, această caracteristică fiind foarte utilă pentru purificarea acestuia pe baza afinitatii acestei cozi . Pentru aceasta, ARN total este trecut printr-o coloană oligo dT-celuloză sau de poli U-Sepharozaâ. Datorită complementarității cozii ARN, acesta se fixează puternic de coloana oligo dT-celuloza sau de poli U-Separozaâ. Spălarea ulterioară îndepărtează ARN-ul nefixat, iar cel fixat este preluat prin eluare. ARN este apoi recuperat din eluat și precipitat cu alcool etilic absolut rece (-20^{0}C). S-au mai introdus pe piața și bile magnetice acoperite de oligo dT. Această metodă permite, după trecerea printr-un câmp magnetic, să se recupereze foarte repede ARN poli A+, plecând chiar de la eșantioane foarte mici.

9. DOZAREA ADN

Se efectuează rar. Dozarea se efectuează prin fotometrie, bazele purinice și pirimidinice absorbind în UV, la 260 nm.

O unitate de D.O., la 260 nm, corespunde la:

- o soluție ADN dublu catenar de 50 μg/ml
- o soluție de ARN sau ADN mono catenar de 25 μg/ml

Aceste valori se aplică acizilor nucleici perfect puri și în soluții omogene. Contaminarea proteinică (proteinele absorb nu numai la 280 nm, ci și la 260 nm). Pentru aceasta facem o a doua măsurătoare la 280 nm a D.O. Un ADN pur poate avea un raport de D.O. 260/D.O. 280 = **1,8** și **2,0**

Contaminarea cu fenol se vede la 270 nm.

Contaminările antrenează și o supraestimare a concentrației reale, și ele riscă să inactiveze sau să interfereze conformațional cu enzimele care vor fi utilizate apoi pentru studiul ADN. ADN nu trebuie să fie foarte concentrat, deoarece astfel de soluții sunt deosebit de vâscoase și antrenează erori de volum la pipetare.

ADN poate fi dozat mult mai bine prin fluorimetrie, după o colorare cu un produs specific – HOECHST 33258.

CAPITOLUL IV

ELECTROFOREZA ACIZILOR NUCLEICI ȘI A PROTEINELOR

1. INTRODUCERE

Electroforeza este o metodă de separare a macromoleculelor încarcate electric, prin migrarea lor diferențiată într-un mediu solid sau semisolid, în prezența unui câmp electric.

Majoritatea moleculelor conțin grupări ionizabile și în condiții speciale (la pH corespunzător), ele tind să migreze într-un câmp electric, însă mișcarea lor este împiedicată de vâscozitate. Migrarea unei molecule cu viteză constantă în soluție liberă, în cursul electroforezei se datorează unui echilibru între forța electrică și vâscozitate.

Rata migrării unei molecule într-un câmp electric depinde de mărimea, forma și sarcina electrică a moleculei. Astfel, un amestec de molecule care prezintă mărime, formă și sarcină electrică diferite vor avea rate de migrare diferite, ceea ce permite separarea lor electroforetică. Separarea optimă a unor astfel de molecule implică stabilirea atentă a condițiilor experimentale: câmpul electric aplicat, tamponul de migrare folosit, dimensiunea porilor din matrița-suport (gel), deoarece toți acești parametri exercită o influență considerabilă asupra mobilității macromoleculelor în cursul electroforezei.

2. GELURILE

Electroforeza se realizează într-o matriță-suport reprezentată de gelul de agaroză, de poliacril-amidă, de acetat de celuloză, de amidon, etc. Matrițele-suport (gelurile) îmbunătățesc rezoluția proteinelor și a acizilor nucleici prin minimizarea difuziei probei și prin reducerea tulburărilor de conducție electrolitică, ce pot apărea ca o consecință a căldurii generate în timpul electroforezei.

Gelul separă proteinele (sau acizii nucleici) de diferite mărimi, comportându-se ca o sită moleculară ce permite trecerea moleculelor mai mici decât porii săi și împiedică migrarea moleculelor mai mari.Cele mai des utilizate sunt gelurile de agaroză și de poliacrilamidă.

Gelurile de agaroză, în funcție de concentrația agarozei, pot prezenta pori cu dimensiuni cuprinse între 50nm și 200nm sau chiar mai mult. Există câteva tipuri de agaroză:

- **agaroza standard** care are o temperatură de topire înaltă (85°–95°C), este folosită pentru a separa și analiza fragmente de ADN cu dimensiuni între 1kb și 25kb;

- **agaroza cu punct de topire scăzut** *(low melting temperature agarose)* are o temperatură de topire mai scăzută decât agaroza standard și este utilizată, în special, pentru recuperarea ADN din gel, acesta având un punct de topire (cca 65°C) mult inferior temperaturii de topire a duplexului ADN. Acest tip de agaroză este utilizat pentru separarea unor fragmente de ADN de 200 până la 800bp, concurând gelurile de poliacrilamidă.

Gelurile de poliacrilamidă sunt utilizate pentru separarea proteinelor și a moleculelor mici de acizi nucleici. Gelurile de PA se formează prin polimerizarea vinilică a monomerilor de acrilamidă, CH2=CH-CO-NH2, în lanțuri lungi de poliacrilamidă și prin reticularea lanțurilor, în urma includerii unui comonomer *(crosslinker)* bifuncțional. Cel mai utilizat comonomer bifuncțional este N,N' metilen-bis-acrilamida, CH2=CH-CO-NH-CH2–NH-CO-CH=CH2. Astfel, concentrația de acrilamidă utilizată determină lungimea medie a lanțului de polimer, în timp ce concentrația de bis-acrilamidă determină gradul de reticulare. Porozitatea gelului de PA este determinată de lungimea catenelor de PA și de gradul de legare încrucișată care apare în timpul reacției de polimerizare. Diametrul mediu al porilor formați este determinat de concentrația monomerului de acrilamidă și a crosslinkerului bifuncțional, astfel că diametrul porilor se poate ajusta.

Catenele de poliacrilamidă legate încrucișat pot fi folosite ca matrițe suport neutre pentru electroforeză, prin care se separă fragmente de ADN dublu catenare sau monocatenare sau proteine. Principalul factor care determină separarea polipeptidelor în timpul electroforezei în gel de poliacrilamidă este dimensiunea porilor gelului.

Pot fi preparate doua tipuri de geluri de poliacrilamidă, în funcție de concentrația de poliacrilamidă, care au aplicații diferite:

- **gelurile cu concentrație uniformă în poliacrilamidă** sunt folosite pentru a separa fie polipeptide cu greutăți moleculare apropiate, fie fragmente de ADN.

- gelurile cu gradient de poliacrilamidă sunt cele mai folosite în analiza secvenței ADN, ele fiind eficiente în separarea fragmentelor de ADN cu dimensiuni cuprinse între 5 și 500bp, care diferă între ele printr-o singură pereche de baze. În gelurile cu gradient de poliacrilamidă, concentrația acrilamidei crește (în timp ce mărimea porilor descrește), în direcția de migrare a proteinei, permițând separarea polipeptidelor dintr-o gamă largă de dimensiuni.

Deși pot fi supuse unei migrări rapide, aceste geluri sunt mai dificil de preparat și de mânuit decât cele de agaroză. Gelurile de poliacrilamidă sunt migrate vertical într-un câmp electric constant.

În funcție de condițiile de lucru, gelurile de poliacrilamidă sunt:

- geluri de PA denaturante sunt folosite pentru separarea și purificarea fragmentelor monocatenare de ADN. Aceste geluri sunt polimerizate în prezența unui agent denaturant (uree sau formaldehidă), care împiedică împerecherea bazelor din acizii nucleici. Aceste geluri se folosesc, de exemplu, la izolarea sondelor de ADN marcate, la analiza produșilor de digestie ai endonucleazei S1, la analiza produșilor de secvențiere a ADN.

- geluri de PA nedenaturante (neutre) sunt folosite pentru separarea și purificarea fragmentelor de ADN dublucatenar, pentru a detecta complexe ADN-proteine.

Procentul de acrilamidă folosit în prepararea gelului este stabilit în funcție de mărimea fragmentelor de ADN care trebuie separate.

Avantajele gelului de PA față de cel de agaroză:

-are o putere de separare mai mare, încât se pot separa molecule de ADN a căror lungime diferă printr-o pereche de baze, la fiecare mie de perechi;

-se pot încărca cantități mai mari de ADN decât în cele de agaroză;

-ADN recuperat din gelurile de PA are puritate mare, calitate indispensabilă pentru continuarea unor experimente.

3. SISTEME TAMPON CONTINUE ȘI DISCONTINUE

Electroforeza poate fi realizată în *condiții continue*, în care aceiași ioni din tamponul de migrare sunt prezenți și în gel, sau în *condiții discontinue*, în care ionii din tamponul de migrare sunt diferiți de ionii din gel. În electroforeza continuă, se utilizează un singur tip de tampon de migrare și un singur tip de gel; în electroforeza discontinuă, se utilizează un gel de concentrare *(stacking gel)* și un gel de separare *(resolving gel)* a fracțiilor din probă, iar tamponul de migrare pentru gelul de concentrare are forță ionică și pH, de obicei, cu 2 unități mai mici decât tamponul de migrare pentru gelul de separare.

În electroforeza continuă, proba este încărcată în gel într-un godeu de pe linia de start. Când se aplică un câmp electric, moleculele din proba migrează prin gel și se separă în funcție de mobilitatea lor electroforetică în benzi înguste.

În electroforeza discontinuă, proba este concentrată de peste 100 de ori înainte de a pătrunde în gelul de separare. Se foloseste un gel de poliacrilamidă de concentrare cu forță ionică scăzută și pori mari, care este turnat în continuarea gelului de separare. Proba este încărcată în gelul de concentrare, iar când câmpul electric este aplicat, moleculele migrează rapid prin acest gel și sunt concentrate într-o zonă foarte îngustă. Discontinuitatea tamponului de migrare face să apară un front mobil de ioni care mătură gelul în urma proteinelor care se vor concentra ulterior. Când frontul de molecule concentrate întâlnește gelul de separare, care are pori mici, datorită pH-ului scăzut al tamponului, se produce deconcentrarea moleculelor care vor intra în gelul de separare, în care rata lor de migrare depinde de dimensiunea lor și de sarcină.

4. CONDITII DE DISOCIERE ȘI DE NON-DISOCIERE

Majoritatea proteinelor au o formă complexă globulară, datorită împachetării lanțurilor lor polipeptidice. Unele proteine au un singur lanț polipeptidic, dar majoritatea sunt compuse din câteva lanțuri polipeptidice.

În condiții care nu determină disocierea lanțurilor lor polipeptidice, proteinele își mențin structura lor naturală, conformația lor, deci și funcția. Astfel, se pot vizualiza enzime folosind coloranți speciali cu care să se detecteze activitatea lor (zimograme).

În condiții de disociere, în care proteinele sunt separate în subunitățile lor, se menține doar structura primară, iar polipeptidele individuale migrează independent. Agenții folosiți pentru disocierea proteinelor sunt detergentul ionic sodium dodecil sulfat (SDS), care se leagă de proteine și le anulează sarcina electrică intrinsecă, și compusul neionic uree, care rupe legăturile de hidrogen și anulează interacțiile hidrofobe. Pentru denaturarea proteinelor sunt necesare concentrații mari de uree (4–8M).

5. PREPARAREA PROBELOR

În electroforeza acizilor nucleici și a proteinelor, se include în probă un colorant care migrează mai repede decat componenții probei, aratând când migrarea este completă. De obicei, se adaugă în proba de analizat glicerol sau sucroză (10%), pentru a se asigura o densitate mai mare probei față de tamponul de migrare. Dacă electroforeza se desfăsoară în condiții de non disociere, trebuie să se lucreze cu grijă, pentru a se evita denaturarea probei.

Când se lucrează în condiții de disociere, probele proteinice sunt de obicei fierte timp de câteva minute în SDS, pentru a se realiza denaturarea și apoi tratate cu 2–mercaptoetanol pentru a reduce punțile disulfidice, care ar lega încrucișat unele polipeptide. Totuși, unele proteine membranare de transport prezintă o modificare indusă de căldură în motilitatea lor electroforetică, care se presupune că se datorează schimbării conformației. De aceea, când se analizează proteine de membrană este recomandat să se stabilească dacă temperatura ridicată produce artefacte în motilitatea electroforetică.

6. DETECTAREA PROTEINELOR ȘI A ACIZILOR NUCLEICI ÎN GELURI

Dintre coloranții folosiți pentru a vizualiza proteinele separate în geluri amintim: *Amido black 10B, Bromphenol blue, Ponceau S, Light green SF și Coomassie brilliant blue G-250* și *R-250*. Însă, cea mai simplă și cea mai folosită metodă de detectare a proteinelor în geluri este colorarea directă cu *Coomassie brilliant blue R-250*. Gelurile sunt scufundate în soluție metanolică de colorant și acid acetic, care simultan precipită și colorează proteinele. Excesul de colorant este îndepărtat prin difuzie pasivă într-un solvent. Metoda de colorare cu Coomassie brilliant blue R-250 permite ulterior, dacă este necesar, o altă colorare, mai convenabilă, cum ar fi colorația argentică.

Proteinele care au fost separate electroforetic pot fi detectate imunochimic în gel. În ultimul timp, se preferă însă transferul proteinelor separate pe nitroceluloză și ulterior se realizează detectarea imunochimică. Această metodă se numeste *Western blotting*.

În cazul acizilor nucleici (ADN sau ARN), cea mai utilizată metodă de vizualizare este colorarea cu un compus fluorescent, *bromura de etidiu*. Bromura de etidiu se leagă la ADN cu o specificitate de secvență foarte mică sau chiar fără specificitate, prin legături *van der Waals*. Colorantul legat la ADN are o fluorescență mai intensă decât atunci când este liber în soluție. Radiația UV de 254nm este absorbită de ADN și este transmisă colorantului, iar radiația de 302nm și 366nm este absorbită chiar de colorant. În ambele cazuri, energia este reemisă la 590nm în zona rosu-orange a spectrului vizibil. Emisia fluorescentă a complexului ADN-bromură de etidiu este de 20–30 de ori mai mare decât cea a colorantului nelegat.

Spre deosebire de gelurile de agaroză, gelurile de PA nu pot fi turnate în prezența bromurii de etidiu pentru că acest colorant inhibă polimerizarea acrilamidei. Totuși, bromura de etidiu este folosită pentru a colora geluri de PA după electroforeză, dar sensibilitatea metodei este scăzută, deoarece PA scade intensitatea fluorescentei bromurii de etidiu. O metodă sensibilă de colorare a gelurilor de PA este colorația argentică, care permite vizualizarea unor fragmente de ADN, care diferă între ele printr-o singură bază azotată.

7. ELECTROFOREZA ÎN MINIGELURI DE AGAROZĂ

În ultimii ani, au fost descoperite metode pentru analiza unor cantități mici de ADN, în timp record, folosind minigeluri de agaroză. Fiecare godeu din aceste minigeluri poate fi încărcat cu cca. 10–100ng de ADN.

Minigelurile sunt folositoare, în special, când este nevoie de un răspuns rapid înainte de a se trece la etapa următoare a procesului de clonare. Pentru că minigelurile pot fi preparate dinainte, migrarea se face rapid (50–60 min), necesită cantități mici de reactivi, se pot economisi timp și bani. Gelul poate fi folosit de mai multe ori: se încarcă un anumit set de probe, după migrarea, vizualizarea și fotografierea gelului, probele sunt migrate excesiv până la trecerea lor în tamponul de migrare. Minigelurile sunt folosite pentru analiza fragmentelor de ADN mai mici de 3Kb.

Factorii de care depinde migrarea ADN în geluri de agaroză:

-greutatea moleculară a ADN – moleculele de ADN dublu catenar mari migrează prin gel mai încet decât cele mici, datorită forței de frecare mai mari și deci faptului că își găsesc drumul mai greu prin porii gelului.

-concentrația agarozei — un fragment de ADN linear, de o anumită greutate migrează cu rate diferite, prin geluri de agaroză de concentrație diferită.

-conformația ADN — formele circulare covalent închise (forma I) circular deschise (forma II) și lineare (forma III) de ADN migrează prin gelurile de agaroză cu rate diferite. În anumite condiții, forma I de ADN migrează mai repede decât forma III, în alte condiții, ordinea este inversată. În majoritatea cazurilor, cel mai bun mod de a distinge între diferite forme conformaționale de ADN este încărcarea în gel a unei probe de ADN circular netratat și a unei probe din același ADN, dar linearizată prin digestie cu o enzimă de restricție, care taie într-un singur situs.

-prezența bromurii de etidiu în gel și în tampoanele de electroforeză –intercalarea bromurii de etidiu determină scăderea numărului de sarcini negative a dublei catene de ADN. Rata de migrare a complexului colorant-ADN linear prin gel este întârziată cu cca. 15%.

-voltajul – la tensiune scăzută, rata de migrare a fragmentelor ADN linear este proporțională cu voltajul aplicat. Pe măsură ce intensitatea câmpului electric este mărită, mobilitatea fragmentelor de greutate moleculară mare crește diferențiat. De aceea, puterea de separare a agarozei descrește pe măsură ce tensiunea crește. Pentru a obține cea mai bună rezoluție a fragmentelor de ADN mai mari de 2Kb, gelurile sunt migrate la 5–8V/cm.

-tipul de agaroză

8. ELECTROFOREZA ÎN GEL DE POLIACRILAMIDĂ CU SDS – *SODIUM DODECYL SULPHATE POLYACRILAMIDE GEL ELECTROPHORESIS* (SDS-PAGE)

O tehnică de separare a proteinelor, în funcție de greutatea lor moleculară, este SDS-PAGE. În sistemele SDS-PAGE, se folosesc tampoane care conțin un detergent, SDS *(Sodium Dodecyl Sulphate)*, care are proprietatea de a denatura proteinele. În solutii de SDS, majoritatea proteinelor alcătuite din multiple subunități sunt denaturate, proteina disociindu-se în subunitățile componente.

Fiecare moleculă de SDS este încărcată negativ. La pH neutru, majoritatea proteinelor sunt învelite uniform cu SDS, care anulează încărcătura intrinsecă a proteinei, astfel că sarcina globală a complexului SDS-proteină este determinată de SDS. Ca urmare, toate complexele SDS-proteină au formă filamentoasă și densități de sarcină electrică aproape identice. De aceea, mobilitatea electroforetică este dată de greutatea lor moleculară. Spre deosebire de electroforeza în gel de agaroză, unde probele sunt încărcate la anod, în cazul SDS-PAGE probele sunt încărcate la polul catodic al gelului. Sub influența câmpului electric, complexele SDS-proteine migrează spre anod, pătrunzând în gel sub forma unei benzi înguste. Pe parcursul gelului, proteinele mari au o rată de migrare superioară proteinelor mici, datorită proprietății de sită moleculară a gelului.

Pentru a determina greutățile moleculare ale componentelor unei probe, se încarcă în gel, în paralel cu acestea, și proteine standard de greutate moleculară cunoscută, iar mobilitățile electroforetice se compară.

9. CONCENTRAREA IZOELECTRICĂ A PROTEINELOR *(ISOELECTRIC FOCUSING)*

Proteinele sunt molecule amfoterice, încărcătura lor netă depinzând de pH-ul mediului. Încărcătura lor este determinată, în special, de lanțurile de aminoacizi de la suprafață, grupările ionizabile -NH2 și -COOH. La pH foarte scăzut, majoritatea proteinelor sunt încărcate pozitiv și când pH-ul este crescut gradat încărcătura netă devine progresiv negativă. Pentru fiecare proteină, există un pH la care încărcătura netă este egală cu zero. Această valoare a pH-ului se numeste punct izoelectric. Pentru majoritatea proteinelor, această valoare este cuprinsă între pH 4 și pH 7.

Concentrarea izoelectrică a proteinelor este o tehnică electroforetică prin care se separă proteinele pe baza punctelor lor izoelectrice. Trăsătura specifică a concentrației izoelectrice este că electroforeza este realizată într-un gradient de pH staționar și proteinele migrează spre o poziție de echilibru. În cursul electroforezei, componentele probei sunt concentrate sub formă de benzi intense, în poziții corespunzătoare punctului lor izoelectric. Concentrarea izoelectrică furnizează informații despre numărul componentelor din amestec și permite determinarea punctului izoelectric al proteinelor din amestec.

Separarea electroforetică prin această metodă este realizată în gradient de pH continuu, ce crește de la anod la catod. Când o proteină este introdusă într-un asemenea gradient, ea va fi respinsă de unul dintre electrozi în funcție de încărcătura sa electrostatică, astfel încât ea va migra spre o poziție din gradientul de pH, în care ea are o sarcină netă egală cu zero. De exemplu, când o proteină este plasată aproape de anod, unde pH-ul este mai scăzut decât valoarea punctului său izoelectric, proteina devine încărcată pozitiv și va migra, în consecință, spre catod. Pe măsură ce migrează, proteina modifică gradientul de pH și pierde progresiv încărcătura sa pozitivă. Dacă proteina s-ar deplasa prin difuzie din poziția corespunzătoare punctului său izoelectric, ea va deveni încărcată electric și va fi deplasată înapoi în poziția corespunzătoare punctului său izoelectric. Datorită acestui efect, proteina este concentrată într-o bandă foarte îngustă.

Concentrarea izoelectrică necesită formarea unui gradient continuu și stabil între cei doi electrozi. Asemenea gradiente nu pot fi formate, însă, de soluții tampon convenționale cu pH-uri diferite. Primele tampoane adecvate acestui tip de electroforeză cuprind o serie de compuși care contin grupe poliamino și policarboxil, care poartă numele generic de **amfoliți**. Ca și proteinele, ei sunt amfoterici. Sub acțiunea unui câmp electric, ei vor migra și se vor concentra la un nivel corespunzător punctului lor izoelectric. Acești compuși au o capacitate de tamponare foarte mare la punctul lor izoelectric și crează, la locul unde sunt concentrați, o zonă cu localizare constantă de un anumit pH. Sunt disponibile în comerț amestecuri de amfoliți care permit obținerea fie a unor gradiente de pH de domeniu larg (de exemplu, a unor gradiente de pH între 3,5 și 9,5), fie a unora de domeniu îngust.

Concentrarea amfoliților este mai rapidă decât concentrarea probelor de proteine, iar timpul necesar proteinelor pentru a ajunge în poziția corespunzătoare punctului lor izoelectric crește direct proporțional cu mărimea moleculei.

Concentrarea izoelectrică a proteinelor este realizată în geluri orizontale de agaroză sau de poliacrilamidă foarte subțiri. Pentru a îmbunătăți rezoluția și a scurta timpul de migrare, se utilizează câmpuri electrice puternice. Concentrarea izoelectrică a proteinelor în prezența ureei este utilizată pentru a determina punctul izoelectric al subunităților proteinice.

10. ELECTROFOREZA BIDIMENSIONALĂ

În general, prin electroforeză, proteinele sunt separate pe baza mărimii sau a încărcăturii lor electrice. Folosind doar unul din cele două principii de separare, este probabil ca mai multe proteine să comigreze și să fie vizualizate ca o singură bandă. Asemenea situatie este de nedorit, pentru că mascarea complexității proteinelor studiate poate duce la o interpretare greșită a rezultatelor. Pentru a evita această situație se folosește elecroforeza bidimensională, care se realizează după două direcții de migrare. Se pot obține rezoluții bune când se realizează două electroforeze care separă proteinele pe principii complet diferite. De exemplu, întâi se pot separa proteinele în funcție de punctul lor izoelectric, prin metoda concentrării izoelectrice a acestora, urmată apoi de o separare în funcție de greutatea lor moleculară, prin metoda SDS-PAGE.

Moleculele de acizi de toate dimensiunile prezintă densități de sarcină foarte asemănătoare la valori de pH apropiate de neutralitate, astfel încât separările bazate pe diferențele de sarcină sunt rareori satisfăcătoare. La valori acide ale pH-ului bazele azotate contribuie cu o ușoară diferență de sarcină, încât până la urmă, sarcina netă depinde și de lungimea lanțului și de compoziția în baze. Fenomenul de împerechere a bazelor dispare la valori scăzute ale pH-ului, iar adaosul de agenti denaturanți (uree sau formaldehidă) distruge structura terțiară și secundară. Lucrul la pH foarte scăzut, în condiții de temperatură înaltă, are de asemenea un efect denaturant.

11. ELECTROFOREZA ÎN GEL DE AGAROZĂ ALCALINĂ

Gelurile de agaroză alcalină sunt migrate la pH mare, ceea ce face ca fiecare rest de timidină și de guanină să piardă un proton, fiind împiedicate astfel formarea legăturilor de H ale acestora cu bazele lor complementare, adenina și timina. ADN denaturat este este menținut sub formă monocatenară și migrează printr-un gel de agaroză alcalină, în funcție de mărimea sa.

Gelurile de agaroză alcalină sunt folosite pentru a măsura mărimea primei și a celei de-a doua catene de ADNc sintetizate de revers-transcriptază; analiza dimensiunii catenei de ADN după digestia hibrizilor ADN-ARN cu nucleaza S1, etc.

Pentru a obține un gel de agaroză alcalină se procedează ca și în cazul unui gel obișnuit căruia, exact înainte de a fi turnat în taviță, i se adaugă un tampon alcalin (NaOH, EDTA) într-o anumită proporție. Soluțiile de NaOH și EDTA intră și în compoziția tamponului de încărcare.

După migrare, are loc neutralizarea gelului într-o soluție de Tris-HCl și NaCl. Gelul neutralizat este apoi colorat în bromura de etidiu 0,5μg/ml. Motivul pentru care bromura de etidiu nu se adaugă în gel, în cazul acestui tip de electroforeză, este că fluorocromul nu se leagă la ADN, la pH-ul ridicat al tamponului de migrare.

12. ELECTROFOREZA ÎN CÂMP ELECTRIC PULSATORIU — *PULSE FIELD GEL ELECTROPHORESIS (PFGE)*

Fragmentele de ADN mai mari de 40Kb nu pot fi separate eficient folosind un câmp electric constant pe gel de agaroză. Aceste fragmente pot fi însă separate prin electroforeză în câmp electric pulsatoriu (PFGE — *Pulse Field Gel Electrophoresis*), în care câmpul electric este schimbat periodic pe două direcții

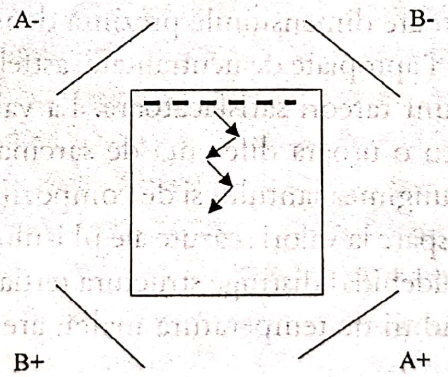


Fig. 1 — PFGE – schema principiului de funcționare a aparatului de electroforeză. A și B reprezintă două seturi de electrozi. Când electrozii A (- și +) sunt activați ADN migrează dinspre anod spre catod, după cum indică prima săgeată. Apoi acești electrozi sunt dezactivați și activați electrozii din setul B (- și +). ADN va migra dinspre anod spre catod, dar pe o direcție perpendiculară pe prima (a doua săgeată). În continuare, după dezactivarea setului de electrozi B, este reactivat setul A de electrozi, ADN va migra după directia inițială (din Sambrook & Russell, 2001)

diferite cu pulsatii de 0,1 până la 1000 de secunde sau chiar mai mult. Această metodă permite separarea moleculelor de ADN de până la 5 Mb în lungime. În cursul migrării, separarea se produce datorită faptului că timpul necesar moleculelor de ADN pentru a-și schimba direcția de migrare, ca raspuns la fluctuația câmpului electric, depinde de mărimea sa: moleculele mai mici se pot reorienta mai repede și de aceea se pot misca prin gel mai repede ca moleculele mai lungi.

Principiul general al PFGE este schițat în figura 1.

Alternarea cu regularitate a câmpurilor A și B are loc pe întregul curs al electroforezei, făcând ca ADN să migreze după o traiectorie în zig-zag, după cum se observă și în figură. Intervalul la care polaritatea câmpului este schimbată poate varia între câteva secunde și câteva ore, direct proporțional cu mărimea fragmentelor de ADN care trebuie separate.

Există mai multe variante de PFGE:

13. ELECTROFOREZA ÎN CÂMPURI TRANSVERSALE ALTERNATIVE — *TRANSVERSE ALTERNATING FIELDS ELECTROPHORESIS (TAFE)*

În cazul acestei variante, migrarea se face pe verticală, gelul este încadrat de două perechi de electrozi (A și B) și este susținut de două stripsuri și de densitatea tamponului. ADN migrează după o traiectorie generală dreaptă, iar câmpul electric este uniform de-a lungul gelului. Unghiul dintre orientările celor două câmpuri electrice alternative este de 110° în dreptul godeurilor, dar este mai mare în partea opusă godeurilor.

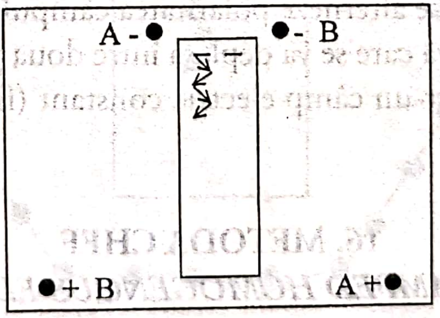


Fig. 2 — TAFE – schema principiului de funcționare a aparatului de electroforeză. A și B (•) reprezintă două seturi de electrozi, săgețile reprezintă direcția de migrare a ADN, (din Sambrook & Russell, 2001).

14. ELECTROFOREZA ÎN CÂMP INVERSAT — *FIELD INVERSION GEL ELECTROPHORESIS (FIGE)*

Această metodă are un principiu foarte simplu: în timpul migrării, câmpul electric generat între cei doi electrozi se inversează cu regularitate, inițial scoțând ADN din godeu, ulterior readucându-l spre godeu. Unghiul dintre cele două câmpuri electrice alternative este de 180°. Timpul în care acționează câmpul electric ce determină migrarea ADN înainte este mai mare decât cel în care ADN migrează înapoi, spre godeu, astfel că migrarea netă a ADN este spre înainte, departându-se de godeu.

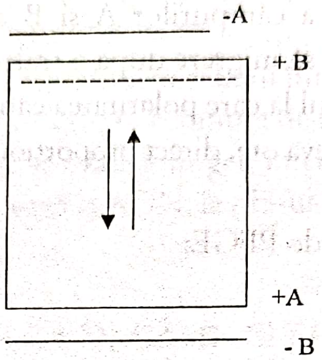


Fig. 3 — FIGE-schema principiului de funcționare a aparatului de electroforeză. A și B reprezintă două seturi de electrozi, săgețile reprezintă direcția și sensul de migrare a ADN, cele două linii reprezintă cei doi electrozi, (după Sambrook & Russell, 2001).

15. ELECTROFOREZA ÎN GELURI ROTATIVE

În acest caz, în loc să se alterneze polaritatea câmpului electric, se plasează un gel pe o platforma rotativă care se va deplasa între două poziții (A și B), între care unghiul este de 120°, într-un câmp electric constant (fig. 4).

16. METODA CHEF
(CONTOUR-CLAMPED HOMOGENOUS ELECTRIC FIELD)

Este o tehnică în care câmpul electric este omogen (fig. 5). Se folosesc 6 grupe de cite 4 electrozi dispuși hexagonal, permițând obținerea unui unghi de reorientare de 120°. Migrarea permite separarea fragmentelor de 12Mb.

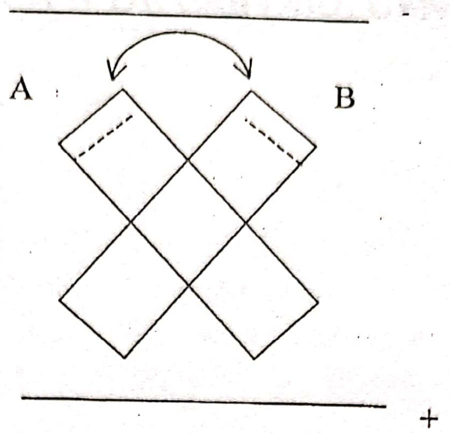


Fig. 4 — Electroforeza rotativă- schema principiului de funcționare a aparatului de electroforeză. A și B reprezintă două poziții între care este deplasat gelul, cele două linii reprezintă cei doi electrozi, (după Sambrook & Russell, 2001).

Factorii care influențează PFGE includ timpul unei pulsatii, intensitatea câmpului, unghiul dintre câmpurile electrice aplicate (in general 105–165°, dar și 90°) și temperatura (4–15°C), compoziția soluțiilor tampon, tipul și concentrația de agaroză. În practică, majoritatea acestor variabile sunt în general menținute, iar o rezoluție satisfăcătoare este obținută prin creșterea timpului unei pulsații pentru separarea moleculelor mari și scăderea acestuia pentru separarea moleculelor mici.

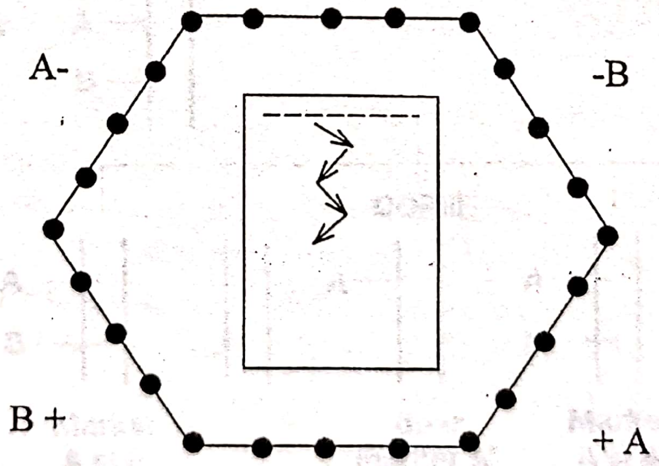


Fig. 5 — CHEF- schema principiului de funcționare a aparatului de electroforeză. A și B reprezintă doua seturi de electrozi ( ), săgețile reprezintă direcția de migrare a ADN, (după Sambrook & Russell, 2001).

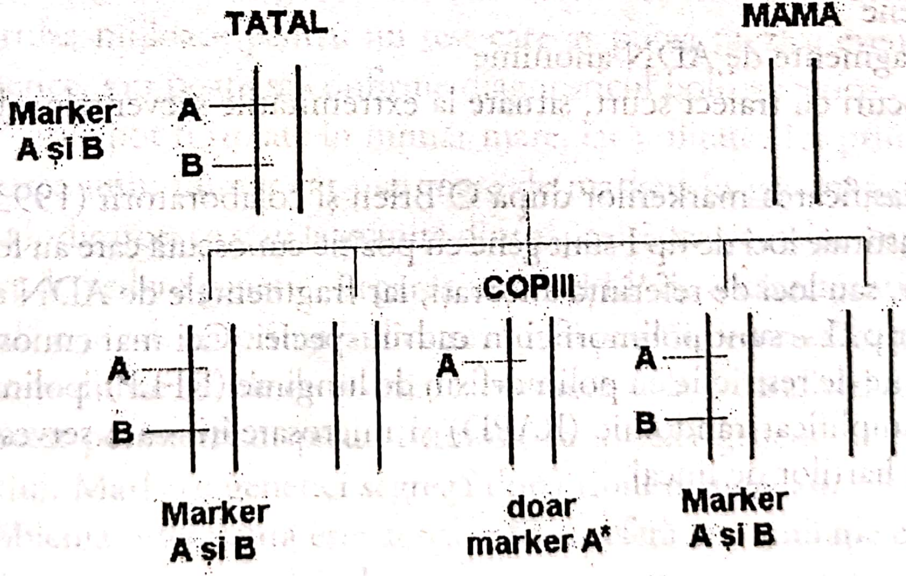
inv. 158021

CAPITOLUL V

PRINCIPII DE CARTARE GENICĂ

1. INTRODUCERE

Harta genetică este reprezentarea grafică a distribuției genelor în cromozomi, realizată prin încrucișări de tipul *intercross* și *backross*, analiza segregărilor mendeliene și a relațiilor de lincaj dintre diverși loci genici. În acest tip de hărți, distanța dintre gene este o funcție a frecvenței recombinărilor prin crossing-over meiotic și se exprimă în centimorgani (cM). De aceea, hărțile genetice sunt denumite și hărți de *linkage* sau de lincaj (fig.4).


TATAL
MAMA
Marker A și B
A
B
COPIII
A
B
Marker A și B
A
doar marker A*
A
B
Marker A și B

* Recombinant: frecvența acestui eveniment reflectă distanța dintre genele pentru markerii A și B

Fig. 4 — Harta genică de lincaj.

Construirea unei hărți genetice se bazează pe:

- markeri morfologici — caracteristici fizice (număr limitat) din care cauză multe hărți sunt compuse din markeri moleculari;

- markeri moleculari: RFLP, RAPD, STS, microsateliți;

- studii de lincaj, la om se bazează pe analiza pedigre-ului familial și studii populaționale. Cartarea genetică de lincaj este folosită la construirea hărților genetice de lincaj ale cromozomilor individuali și localizarea genelor implicate în boli genetice. Analiza genetică de linkaj estimează frecvența crossing-overului (recombinării) realizată între cromozomii omologi, pe parcursul meiozei.

2. HARTA FIZICĂ

Harta fizică este reprezentarea grafică a distribuției genelor în cromozomi, realizată prin manipularea și observarea citologică a cromozomilor. De aceea, harta fizică mai poartă numele de hartă citologică.

Construirea unei hărți citologice se bazează pe: hibridizare fluorescentă *in situ* (*fluorescence in situ hzbridization — FISH*), flow-citometrie cromozomală, hibridare somatică, dozaj genic.

Fiecare tip de hartă are propriul său sistem de markeri. Astfel, markerii se împart în trei categorii principale:

1. gene
2. fragmente de ADN anonime
3. locuri cu traiect scurt, situate la extremitățile secvențelor delimitate (STS).

În clasificarea markerilor după O'Brien și colaboratorii (1993), genele care constituie loci de tip I sunt gene cu poziție cunoscută care au fost cartate anterior, sau loci de referință ancorați, iar fragmentele de ADN anonime, loci de tip II – sunt polimorfici în cadrul speciei. Cei mai cunoscuți sunt fragmente de restricție cu polimorfism de lungime (RFLP), polimorfismul ADN amplificat randomic (RAPD) și microsateliții care servesc la construcția hărților de lincaj.

3 METODE DE CARTARE GENICĂ

Procedeele de cartografiere genică se împart în:

1. metode clasice, cu obținere de hărți genetice;

2. metode citologice, moleculare, cu obținere de hărți fizice.

Metodele clasice se bazează pe studii de lincaj familiale, realizate prin backrossuri și intercrossuri.

Metodele citologice cuprind metodele citogenetice: hibridarea celulelor somatice, cromozomii artificiali de drojdie de bere (YAC), FISH, electroforeza în gel în câmp pulsator etc.

4. METODE GENETICE DE CARTARE

4.1. UTILIZAREA POLIMORFISMULUI DE LUNGIME AL FRAGMENTELOR DE RESTRICȚIE (RFLP)

Secvențele RFLP sunt secvențe scurte de ADN randomic. Ele nu sunt încă pe deplin caracterizate funcțional și sunt detectate prin Southern blotting.

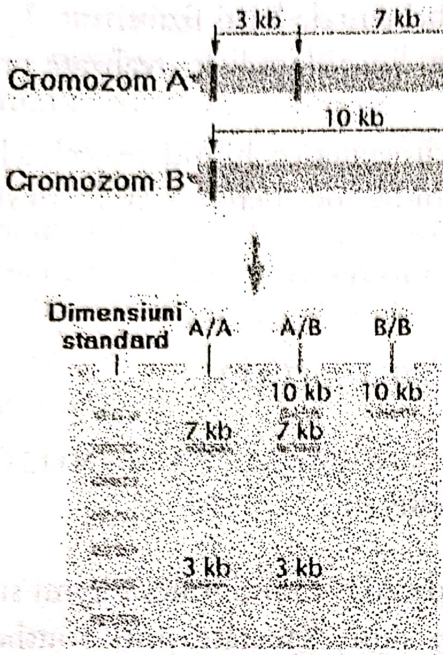
Deleții și rearanjamente ale situsurilor de restricție crează polimorfisme în populații. Profilul unei serii de polimorfisme poate defini componenta genetică a unui individ. Polimorfismele specifice pot fi uneori corelate cu modelul eredității unei boli. Pe această cale se poate localiza determinantul unei boli într-o anumită regiune cromozomală. Dacă este strâns lincat, RFLP poate furniza mijloace pentru un test care ar putea prezice evenimentul bolii genetice, sau poate să confirme diagnosticul bolii genetice.

RFLP-urile pot fi izolate în număr mare, iar utilitatea lor primară este în depistarea unui număr cât mai mare de markeri în genom care pot fi folosiți ca indicatori ce stau la granița dintre poziția secvențelor importante din punct de vedere genetic. Legarea unui RFLP de o caracteristică fizică sau o boală este adesea prima indicație a unei poziții pentru această boală.

Diferența dintre hărțile de restricție, obținute de la doi indivizi constituie RFLP. Acest polimorfism poate fi folosit ca marker genetic în evaluarea genotipului. Markerii genetici segregă după tipul mendelian.

O problemă interesantă este aceea care se referă la o mutație cu efecte cunoscute asupra fenotipului, dar pentru care nu este cunoscută nici gena corespondentă, nici proteina.

Dacă polimorfismele de restricție apar la întâmplare în genom, este foarte probabil ca unele să apară în imediata vecinătate a unei gene țintă. Astfel



GENOTIP	DIMENSIUNE
Homozigot pentru A (A/A)	3 kb, 7 kb
Heterozigot (A/B)	3 kb, 7 kb, 10 kb
Homozigot pentru B (B/B)	10 kb

Fig. 5 — Producerea, detecția și moștenirea RFLP-urilor (Klug și Cummings, 1997).

de markeri de restricție pot fi identificați prin lincajul lor restrâns în fenotipul mutant. Comparând harta de restricție a ADN obținut de la pacienții care manifestă o boală ereditară, cu aceea a ADN dintr-o populație normală, se poate identifica întotdeauna un situs particular de restricție. Identificarea unui astfel de marker are două consecințe:

1) poate oferi o procedură de diagnostic pentru identificarea bolii. Unele dintre bolile umane, bine caracterizate genetic, nu pot fi ușor definite în termeni moleculari. Dacă un marker de restricție este legat de fenotip, atunci prezența lui poate fi folosită la diagnosticul pre- și postnatal al bolii.

2) poate conduce la izolarea genei. Markerul de restricție trebuie să se situeze relativ aproape de gena pe harta genetică, dacă cei doi loci se combină rar sau niciodata.

RFLP apare relativ frecvent în genomul uman pentru a fi folosit în cartarea genetică. Dacă se compară secvențele alelice ale unei perechi de cromozomi, în perechile de baze individuale apar diferențe cu o frecvență mai mare de 1%. Acele modificări de baze, care afectează situsurile de restricție pot fi detectate ca RFLP.

4.2. UTILIZAREA METODEI MICROSATELIȚILOR

Microsateliții constau din secvențe nucleotidice scurte de 1–6 pb, repetate în tandem de ordinul zecilor. Datorită numărului variabil de unități de baze care intră în componența tandemurilor, deobicei, microsateliții sunt înalt polimorfici, deosebindu-se de majoritatea fragmentelor de restricție dialelice, adică bazate pe prezența sau absența unui loc de clivare enzimatică. Mutațiilor apărute la nivelul lor pot fi o cauză importantă a unor maladii neurologice și neuromusculare și, de asemenea, acestea sunt markeri pentru cancerele umane (Caskey și colab., 1992; Thibodeau și colab., 1993; Aaltonen și colab., 1993; Tautz și Schlotterer, 1994). Investigarea bazei

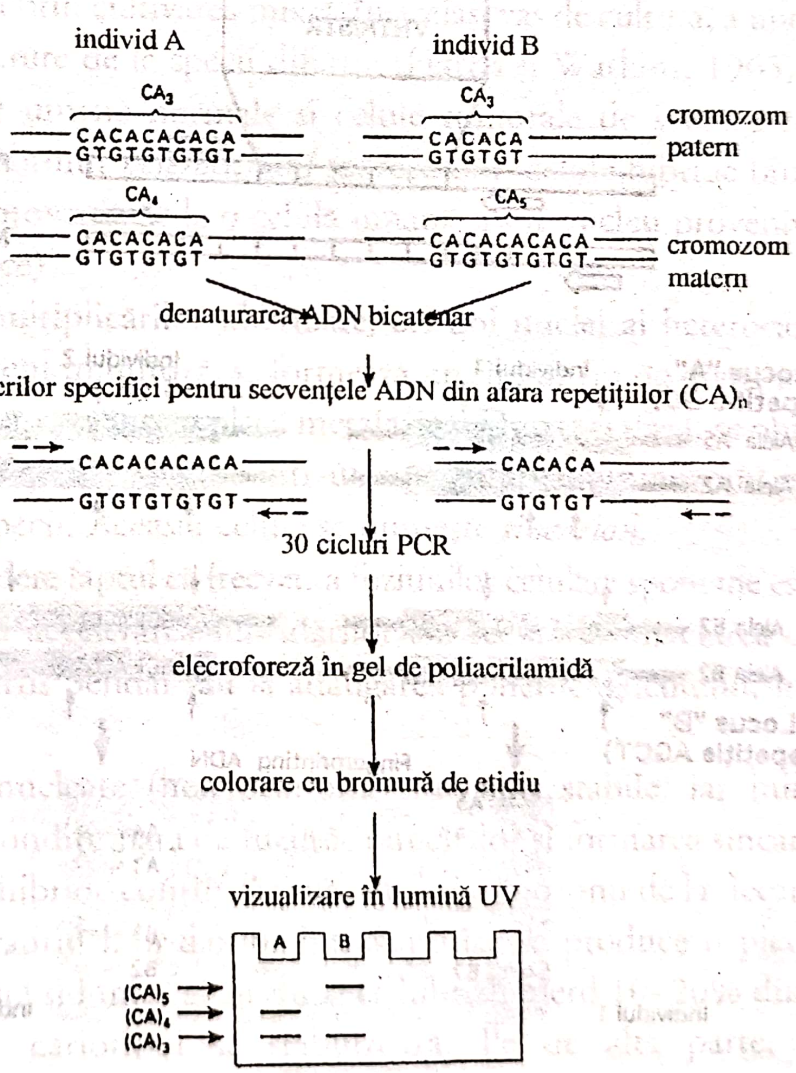

individ A
individ B
CA_3
CACACACACA
GTGTGTGTGT
CA_3
CACACA
GTGTGT
cromozom patern
CA_4
CACACACA
GTGTGTGT
CA_5
CACACACACA
GTGTGTGTGT
cromozom matern
denaturarea ADN bicatenar
adăugarea primerilor specifici pentru secvențele ADN din afara repetițiilor $(CA)_n$
CACACACACA
GTGTGTGTGT
CACACA
GTGTGT
30 cicluri PCR
elecroforeză în gel de poliacrilamidă
colorare cu bromură de etidiu
vizualizare în lumină UV
A
B
$(CA)_5$
$(CA)_4$
$(CA)_3$

Fig. 6 — Schema analizei prin PCR a microsateliților.

genetice a acestor maladii umane a dus la creșterea înțelegerii procesului mutațional al microsatelitilor în general. Deoarece polimorfismele microsatelitice sunt vizualizate prin analiza PCR, fiecare locus microsatelitic poate fi considerat un loc delimitat de anumite secvențe – STS (*sequence-tagged site*), cele din primeri fiind etichete secvențiale (*sequence tags*) (Fig. 6).

Microsateliții sunt deasemenea cunoscuți ca polimorfisme VNTR (*"variable number of tandem repeats"*). Sunt secvențe repetitive produse din secvența matriță foarte scurtă – TG/CA (Fig. 7).

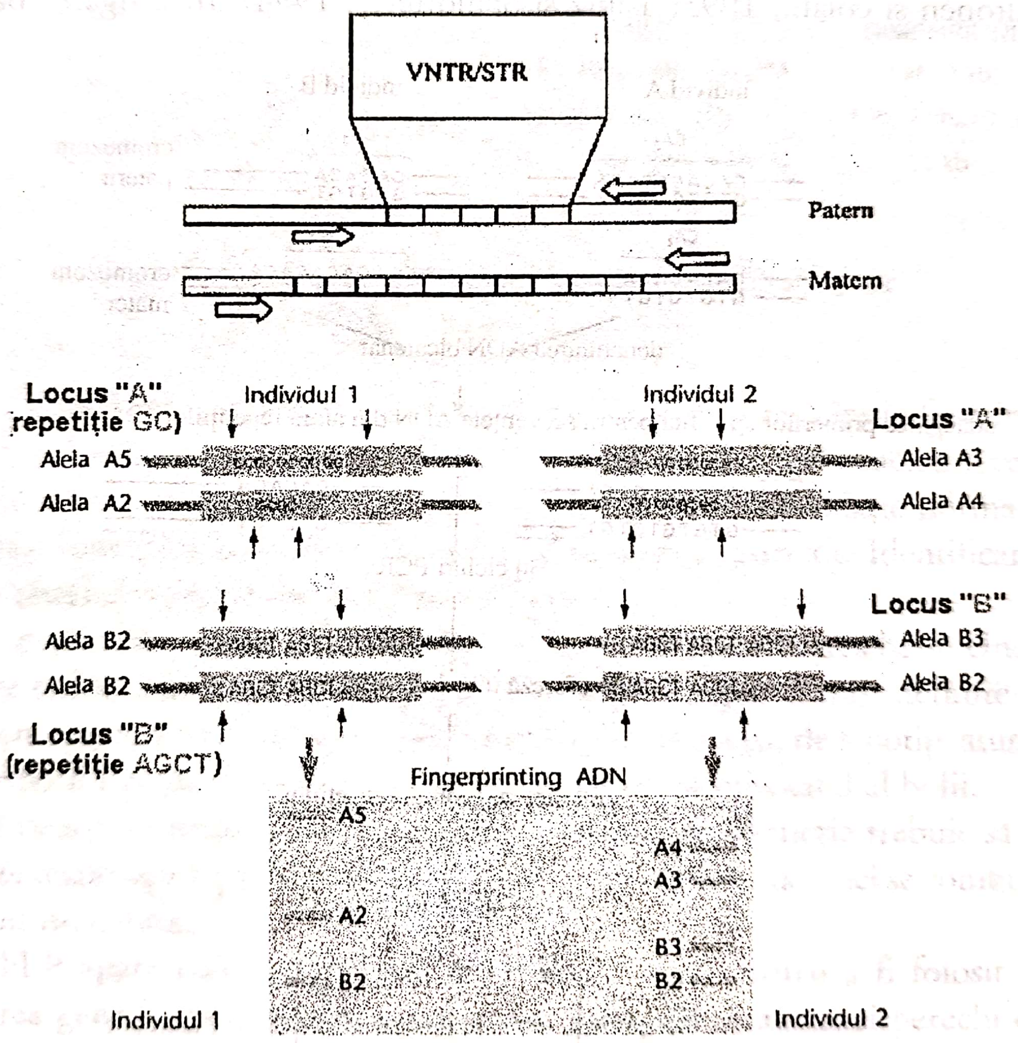

VNTR/STR
Patern
Matern
Locus "A" (repetiție GC)
Individul 1
Individul 2
Locus "A"
Alela A5
Alela A2
Alela A3
Alela A4
Locus "B"
Alela B2
Alela B2
Alela B3
Alela B2
Locus "B" (repetiție AGCT)
Fingerprinting ADN
A5
A4
A3
A2
B3
B2
B2
Individul 1
Individul 2

Fig. 7 — Schema identificării polimorfismelor VNTR (după Griffiths și colab., 1996)

4.3. METODE CITOLOGICE DE CARTARE

4.3.1. METODA HIBRIDĂRII CELULELOR SOMATICE

În anul 1960, Barski și colaboratorii au descoperit fenomenul de fuziune spontană „in vitro“ a celulelor somatice provenite de la aceeași specie. Cultivând înpreună celulele somatice neoplazice de șoarece, s-a observat că după 3 luni de cultură mixtă apare un tip celular nou, caracterizat prin prezența unui număr de cromozomi corespunzător sumei cromozomilor celor două celule parentale.

Mai târziu, s-a constatat că hibridarea celulelor somatice se produce în mod spontan și prin cultivarea mixtă, în același vas de cultură, a unor celule somatice provenite de la specii diferite (Harris și Watkins, 1965). Astfel, folosind celule umane normale și celule tumorale de șoarece ca celule parentale, s-a obținut *heterocarioni* șoarece-om (celule hibride binucleate, cu un nucleu provenit de la o celulă umană și un nucleu provenit de la o celulă de șoarece).

În cursul multiplicărilor ulterioare, cei doi nuclei ai heterocarionului intră concomitent în mitoză, se formează un singur fus de diviziune și toți cromozomii se așează într-o placă metafazică. După telofază, se obțin două celule fiice care conțin, fiecare într-un nucleu unic, cromozomi proveniți de la ambele specii. Această celulă se numește *sincarion*.

Având în vedere faptul că frecvența fuziunilor celulare spontane este foarte scăzută, pentru accelerarea hibridărilor s-a recurs la infectarea celulelor parentale cu virus Sendai sau la adaugarea polietilenglicolului, în mediu de cultură.

Celulele binucleate (heterocarionii) nu sunt stabile, iar mitoza lor continuă este condiționată de fuziunea nucleilor și formarea sincarionilor. Inițial celulele hibride conțin câte un set de cromozomi de la fiecare celulă parentală. În cadrul hibridărilor intraspecifice se produce o pierdere de cromozomi lentă și limitată, iar după ce hibrizii pierd 10–20% din totalul cromozomilor, cariotipul se stabilizează. Pe de altă parte, hibrizii interspecifici, pierd treptat, în mod preferențial, cromozomi proveniți de la una din speciile parentale implicate în fuziune.

Hibrizii celulari soarece x om și hamster chinezesc x om pierd în mod preferențial cromozomii umani. Hibrizii celulari șobolan x om elimină preferențial cromozomii de șobolan.

Hibridarea somatică interspecifică este utilizată în cartarea genică tocmai datorită pierderii preferențiale de către hibrizii celulari ai cromozomilor uneia dintre speciile parentale.

Pierderea unui cromozom anume este însoțită de pierderea unei anumite enzime din mediul de cultură. Ca urmare, atât timp cât cromozomul respectiv este prezent în celula hibridă, este prezentă și enzima. Dacă un cromozom a fost eliminat și enzima nu este detectabilă electroforetic, atunci sigur enzima respectivă este sintetizată de o genă situată pe cromozomul eliminat.

Selecția și izolarea celulelor hibride din amestecul de celule se poate face prin mai multe metode. Cea mai obișnuită este tehnica ce utilizează linii celulare defecte din punct de vedere metabolic (Littlefield, 1964).

Hibrizii somatici interspecifici permit nu numai stabilirea cromozomului pe care se află gena de interes, dar și poziția ei pe cromozomul respectiv. În acest scop, ADN este extras din hibrizi somatici și prelucrat mai departe prin metoda Southern.

Imaginea obținută prezintă unele particularități datorită existenței amestecului de ADN rezultat din hibrizii somatici, ceea ce nu împiedică, însă, interpretarea corectă.

4.3.2. HIBRIDIZAREA MOLECULARĂ SOUTHERN, NORTHERN ȘI WESTERN BLOTTING

La baza acestei metode stă fenomenul de coplementaritate și permite identificarea macromoleculelor de interes dintr-un număr mare de alte molecule. Complementaritatea este recunoașterea moleculară specifică de secvență sau de formă, care se produce atunci când două molecule sunt legate împreună. Proprietatea secvențelor complementare de a se lega sau hibridiza una cu alta poate fi utilizată în identificarea moleculelor care conțin aceeași secvență unică de nucleotide. Hibridizarea se realizează chiar și atunci când secvențele complementare reprezintă o parte a unui amestec complex de molecule de acizi nucleici. Hibridizarea analitică presupune hibridizarea unei secvențe marcate, numită – probă (sau sondă) cu o secvență nemarcată, numită — țintă. Secvența probă (sonda) este cunoscută și se marchează radioactiv sau neradioactiv, iar ținta este necunoscută și urmează a fi identificată prin hibridizare.

Complementaritatea dintre o moleculă probă și o moleculă țintă determină formarea unui complex probă-țintă. Se poate identifica localizarea acestui complex, dacă moleculele probă sunt marcate radioactiv sau neradioactiv (enzimatic). Localizarea acestui complex poate fi utilizată pentru a obține informații despre moleculele țintă. Hibridizarea se poate realiza în soluție sau pe filtre, bazându-se pe denaturarea și renaturarea ADN.

În soluție, se pot forma complexe moleculare hibride (hibrizii moleculari) de următoarele tipuri:

- ADN – ADN. O moleculă probă de ADN monocatenar poate forma un hibrid dublucatenar, împerecheat cu un ADN monocatenar țintă, dacă secvența probă este complementară secvenței țintă.
- ADN – ARN. O moleculă probă de ADN monocatenar poate forma un hibrid dublucatenar cu un ARN țintă, dacă secvența probă este complementară secvenței țintă.
- proteină – proteină. O moleculă probă de anticorp (Ac) poate forma un complex cu o moleculă proteinică țintă, dacă situsul de legare la antigen (Ag) al Ac se poate lega la un epitop (regiunea antigenică mică) pe proteina țintă. În acest complex hibridul se numește complex Ag – Ac.

Exista două caracteristici importante pentru hibridizare:

1) Reacțiile de hibridizare sunt specifice – probele se vor lega doar la ținte cu secvență complementară.

2) Reacțiile de hibridizare se vor produce în prezența unor mari cantități de molecule similare, dar nu identice cu ținta. O probă poate găsi o moleculă țintă într-un amestec, dar nu molecule complementare.

Aceste proprietăți urmează a se utiliza în hibridizare pentru a căuta o moleculă de ADN, ARN, sau proteină, într-un amestec complex ce conține o mulțime de molecule similare.

Hibridizarea în soluție are o valoare experimentală mică – dacă se amestecă o soluție de ADN cu o soluție de probă radioactivă se obține doar o soluție de ADN radioactivă. Nu se pot distinge hibrizii din moleculele nehibridizate, pentru că trebuie în primul rând să se separe amestecul de molecule (Fig. 8).

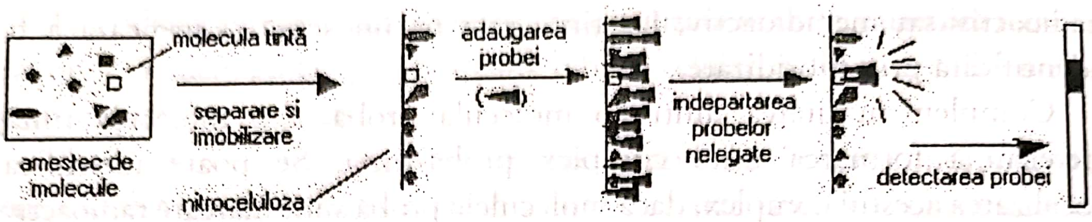


Fig. 8 — Tehnica de hibridizare *in situ* (după Brian White, 1995)

Aceste molecule trebuie să fie imobilizate pe un suport solid, astfel, ca ele să rămână în aceeași poziție pe durata probării (*probing*) și spălării. Se adaugă proba, apoi proba nelegată specific se îndepărtează, astfel detectându-se proba specifică. Locul unde este detectată proba corespunde cu localizarea macromoleculei țintă imobilizată.

Denumirea bloting-urilor vine de la tipul de moleculele țintă.

- Pentru ADN — *Southern blotting*: ADN tăiat cu enzime de restricție – ADN marcat radioactiv.
- Pentru ARN — *Northern blotting*: ARN — ADN sau ARN marcat radioactiv.
- Pentru proteine — *Western blotting*: proteine — Ac marcați radioactiv sau enzime.

Southern blotting. Prin Southern blotting fragmentele de ADN sunt separate prin electroforeză în gel de agaroză; ADN dublu catenar este denaturat prin incubarea gelului în soluție alcalină NaOH 0,5N, apoi neutralizat. După neutralizarea soluției alcaline, gelul este plasat într-un rezervor ce conține o soluție salină, tamponată și se suprapune un filtru care se acoperă cu foi de hârtie de filtu. Tamponul din rezervor trece prin gel, purtând cu el fragmente de ADN. Acizii nucleici monocatenari se leagă ireversibil pe filtru prin expunere la UV. Pe durata transferului, fragmentele își păstrează pozițiile sale. Transferul se realizează prin capilaritate la forță ionică mare.

Northern blotting. Este un proces similar cu Southern blotting, aplicat la moleculele de ARN. Electroforeza este efectuată în prezența unui agent denaturant care previne interacțiile inter- și intramoleculare, încât va face posibilă separarea diferitor tipuri de ARN.

După transfer, fragmentele de ARN monocatenar sunt fixate pe filtru. Filtrul se pune într-un tampon de hibridizare și orice sondă adăugată filtrului se va lega de fragmentul complementar. Membrana sau filtrul pe care s-au transferat acizii nucleici se incubează cu o probă complementară, potrivit condițiilor de hibridizare.

Ca probă poate fi orice ADN natural clonat sau oligonucleotide scurte, sintetizate chimic.

În cazul Southern-, Northern- și Western blotting-ului, separarea inițială a moleculelor se face pe baza greutății moleculare.

În general, procesul se desfășoară în următoarele etape: electroforeză, transfer pe suport solid, blocarea, prepararea probei, hibridizarea, spălarea și detecția hibrizilor probă-țintă.

Electroforeza. Prin electoforeză se separă moleculele pe baza dimensiunii lor. Separarea se face de obicei în gel de agaroză sau poliacrilamidă.

- Pregătirea ADN pentru Southern blot: ADN este mai întâi tăiat cu enzime de restricție și fragmentele de ADN rezultate sunt menținute în formă lineară ;
- Pregatirea ARN pentru Northern blot: deși ARN este monocatenar, moleculele de ARN au adesea regiuni mici care pot forma structuri secundare împerecheate. Pentru a preveni aceasta, ARN este pretratat cu formaldehidă;
- Pregatirea proteinelor pentru Western blot: proteinele au structuri extinse secundare și terțiare și nu sunt încărcate mereu negativ. Proteinele sunt tratate cu SDS (*sodium dodecyl sulfate*) care îndepărtează structurile secundare și terțiare și conferă proteinei sarcini negative.

Transferul pe suport solid. După ce ADN, ARN, sau proteina au fost separate pe baza greutății moleculare, acestea se transferă pe un suport solid, înainte de hibridizare. Acesta este în sine procesul de *blotting*, motiv pentru care toate aceste tehnici se numesc blotting-uri. De obicei, suportul solid este o foaie de hârtei de nitroceluloză, uneori sunt utilizate și alte materiale (filtru de nylon). ADN, ARN, proteina se lipesc bine pe nitroceluloză într-o manieră independentă de secvență.

ADN, ARN, proteinele pot fi transferate pe nitroceluloză pe una din cele două căi:

1) prin electroforeză — prin avantajul sarcinilor negative ale moleculelor (Fig. 9);

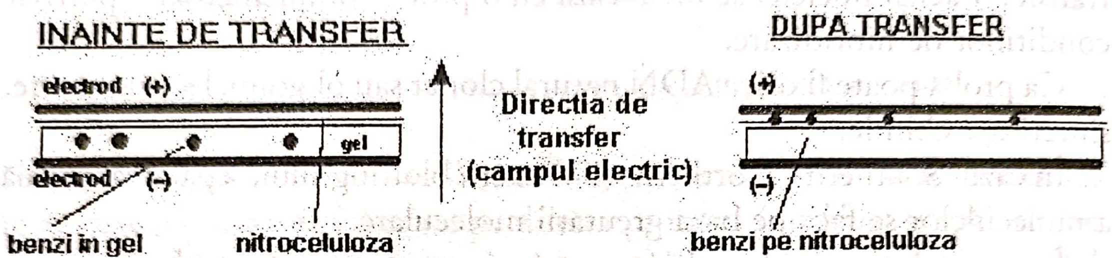

INAINTE DE TRANSFER
electrod (+)
gel
electrod (–)
benzi in gel
nitroceluloza
Directia de transfer (campul electric)
DUPA TRANSFER
(+)
(–)
benzi pe nitroceluloza

Fig. 9 — Transferul moleculelor de ADN, ARN sau proteine pe suport solid prin metoda electroforetică (după Brian White, 1995)

2) prin blotting capilar – în care moleculele sunt transferate în cursul unui curent de soluție tampon de pe hârtia de filtru umedă spre hârtia de filtru uscată (Fig. 10).

Notă: În Southern blot, moleculele de ADN din gel sunt dublucatenare, deci ele trebuie să fie denaturate în formă monocatenară, pentru ca proba să hibridizeze cu acestea. Pentru ca acest ADN să fie transferat, se utilizează

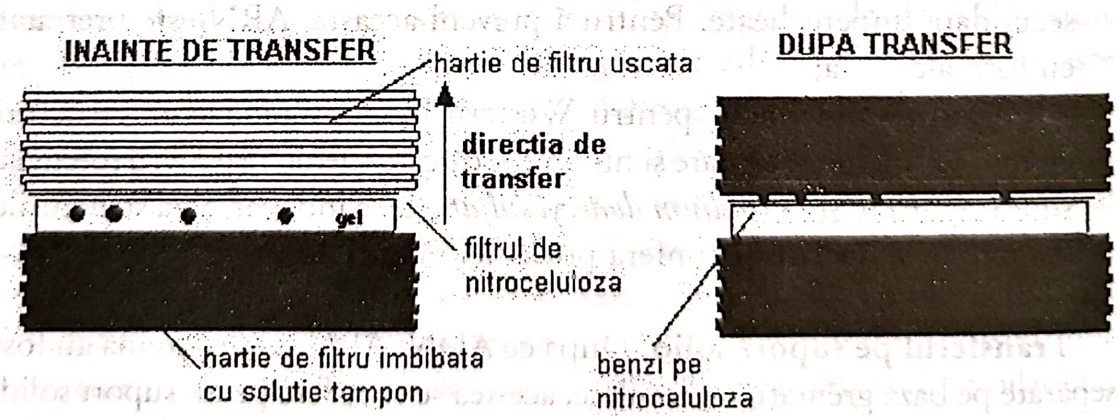

INAINTE DE TRANSFER
hartie de filtru uscata
directia de transfer
gel
filtrul de nitroceluloza
hartie de filtru imbibata cu solutie tampon
DUPA TRANSFER
benzi pe nitroceluloza

Fig. 10 — Transferul moleculelor de ADN, ARN sau proteine pe suport solid prin metoda capilară (după Brian White, 1995)

o soluție tampon puternic alcalină care determină separarea catenelor ADN și legarea lor pe filtru ca molecule monocatenare.

Blocarea. În acest punct, suprafața filtrului are pe ea molecule separate, precum și multe spații între coloane unde moleculele nu s-au legat. Dacă se adaugă proba direct pe filtru, în același moment proba se va lipi și de aceste părți libere ale filtrului, simultan ca și moleculele trasferate din gel, în rezultat se va obține un filtru complet acoperit cu probă care va face imposibilă localizarea hibrizilor probă-țintă. Pentru aceasta filtrele sunt înmuiate într-o soluție de blocare, care conține o concentrație mare de ADN, ARN sau proteină. Aceasta „îmbracă“ filtrul și previne alipirea probei direct de filtru. Pe durata hibridizării se dorește ca proba să se lege doar de moleculele țintă.

4.3.3. PREPARAREA PROBEI

Proba se marchează anterior, prin prehibridizare, prin încorporarea nucleotidelor marcate radioactiv sau modificate chimic pentru a fi detectate imunologic. Prepararea probelor ce dă sensibilitate înaltă și marcări specifice este crucială pentru succesul analizei Southern sau Northern blotting.

Obiectivul este să se creeze o copie marcată radioactiv a fragmentului ADN dublucatenar. Procesul de obicei începe cu un fragment de restricție dintr-o plasmidă care conține gena de interes. Plasmida este supusă digestiei cu o enzimă de restricție particulară, apoi este supusă electroforezei în gel de agaroză. Deoarece o plasmidă are de obicei mai puțin de 20 kpb, rezultă 2–10 fragmente de ADN de lungimi diferite. Dacă se cunoaște harta de restricție a plasmidei, banda dorită poate fi identificată și scoasă din gel, apoi extras ADN. Deoarece benzile sunt bine separate, ADN izolat reprezintă o populație pură de fragmente ADN dublucatenare identice. Fiecare probă oligonucleotidică de 20–50 nucleotide lungime conține complementul unei secvențe precise de acid nucleic care urmează să fie detectat. Fragmentul de restricție este apoi marcat cu Random Hexamer Labeling.

Sinteza chimica a ADN este efectuata prin cuplarea primelor baze de la capatul 3' al secventei dorite (primerul) si efectuarea unor cicluri seriale de adiție de nucleotide în direcția 3'→5' (sinteza). Aceasta se bazează pe tehnica PCR.

ADN matriță se denaturează, catenele fiind separate prin fierbere.

Se adaugă un amestec de hexameri ADN (6 nucleotide de ADN monocatenar) ce se leagă la multe situsuri de-a lungul fiecărei catene de ADN matriță.

ADN polimeraza este adăugată împreună cu dATP, dGTP, dCTP, dTTP (unul fiind marcat radioactiv). De obicei, fosfatul legat de zahăr este sintetizat din ^{32}P, care este radioactiv.

Amestecul este supus denaturării termice pentru separarea lanțurile și a fi pregătit pentru hibridizare (Fig. 11).

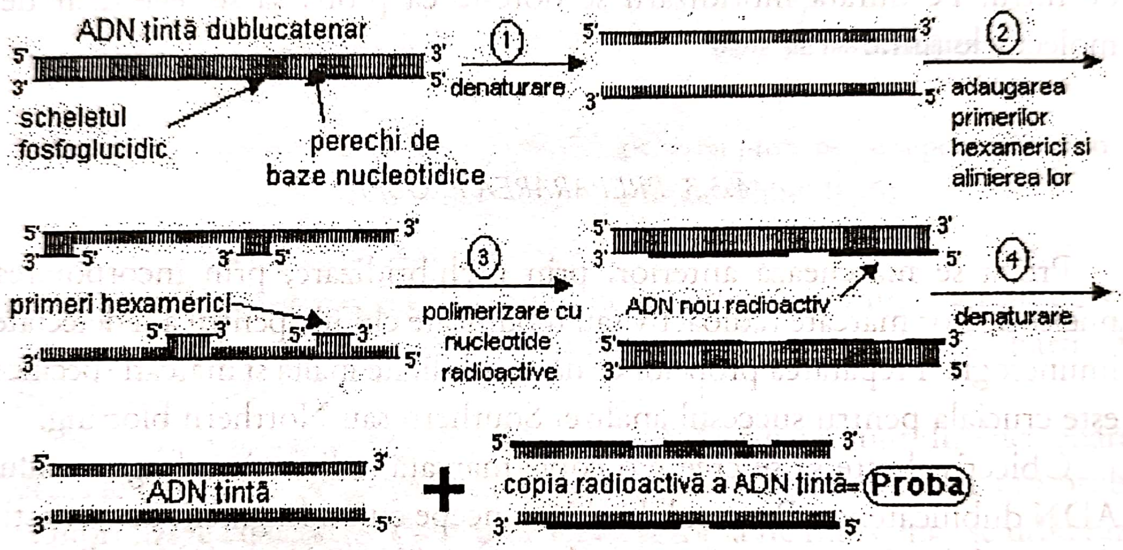

ADN țintă dublucatenar
5'
3'
3'
5'
①
denaturare
②
adaugarea primerilor hexamerici si alinierea lor
scheletul fosfoglucidic
perechi de baze nucleotidice
primeri hexamerici
③
polimerizare cu nucleotide radioactive
ADN nou radioactiv
④
denaturare
ADN țintă
copia radioactivă a ADN țintă= Proba

Fig. 11 — Prepararea probei pentru hibridizare (după Brian White, 1995)

Astfel, se produce o copie de ADN monocatenara radioactiva a ambelor catene de ADN tinta pentru a fi utilizate ca probă.

4.4. HIBRIDIZAREA

În toate 3 bloturi, proba marcată radioactiv este adăugată pe filtrul supus blocării, în soluție tampon și incubat pentru câteva ore pentru a putea permite moleculelor-probă să găsească moleculele sale țintă.

4.5. SPĂLAREA

După ce s-au format hibrizii între probă și țintă, este necesar să se îndepărteze orice probă de pe filtru care nu s-a legat la macromoleculele țintă. Deoarece filtrul de nitroceluloză este absorbant, unele probe se infiltrează în filtru și trebuie îndepărtate; dacă nu sunt îndepărtate, tot filtrul va fi radioactiv și hibrizii specifici nu vor fi detectabili.

Pentru aceasta, filtrul este clătit în mod repetat în câteva băi de soluție tampon, pentru a îndepărta orice probă nehibridizată.

Notă: în Southern și Nouthern blot, hibrizii se pot forma între molecule cu secvențe similare, dar nu neapărat identice (ex: aceeași genă, de la două specii diferite). Această proprietate poate fi utilizată pentru studiul genelor de la organisme diferite sau în studiul genelor mutante. Condițiile de spălare pot fi diferite, și deci, sunt menținuți hibrizii cu diferite neîmperecheri. Aceasta se numește controlul stringenței (severității) – temperatura de spălare este mai crescută — spălare stringentă – se permit mai puține neîmperecheri per hibrid.

4.6. DETECTAREA HIBRIZILOR PROBĂ-ȚINTĂ

În acest punct, avem o coală de filtru de nitroceluloză cu spoturi de probă legată oriunde, moleculele-probă au putut forma hibrizi cu țintele lor. Filtrul acum arată ca o foaie albă de hârtie, unde trebuie să se detecteze locul legării probei.

4.7. AUTORADIOGRAFIA

Dacă proba este radioactivă, particulele radioactive care au fost emise pot fi expuse unui film cu raze X. Peste filtru se pune un film și se lasă la întuneric pentru o perioadă de la câteva zile până la câteva săptămâni, filmul va fi expus acolo unde proba s-a legat pe filtru. După developare, vor apărea spoturi întunecate pe film, oriunde s-a legat proba (Fig. 12).

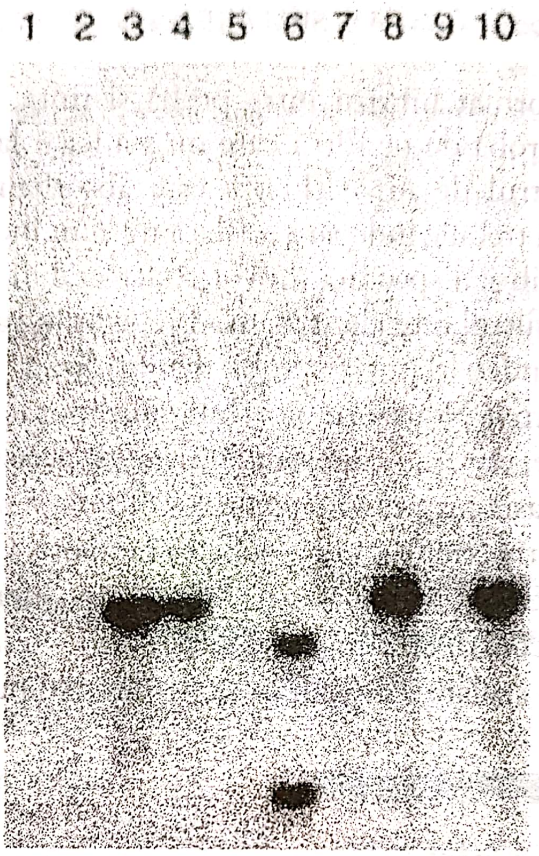
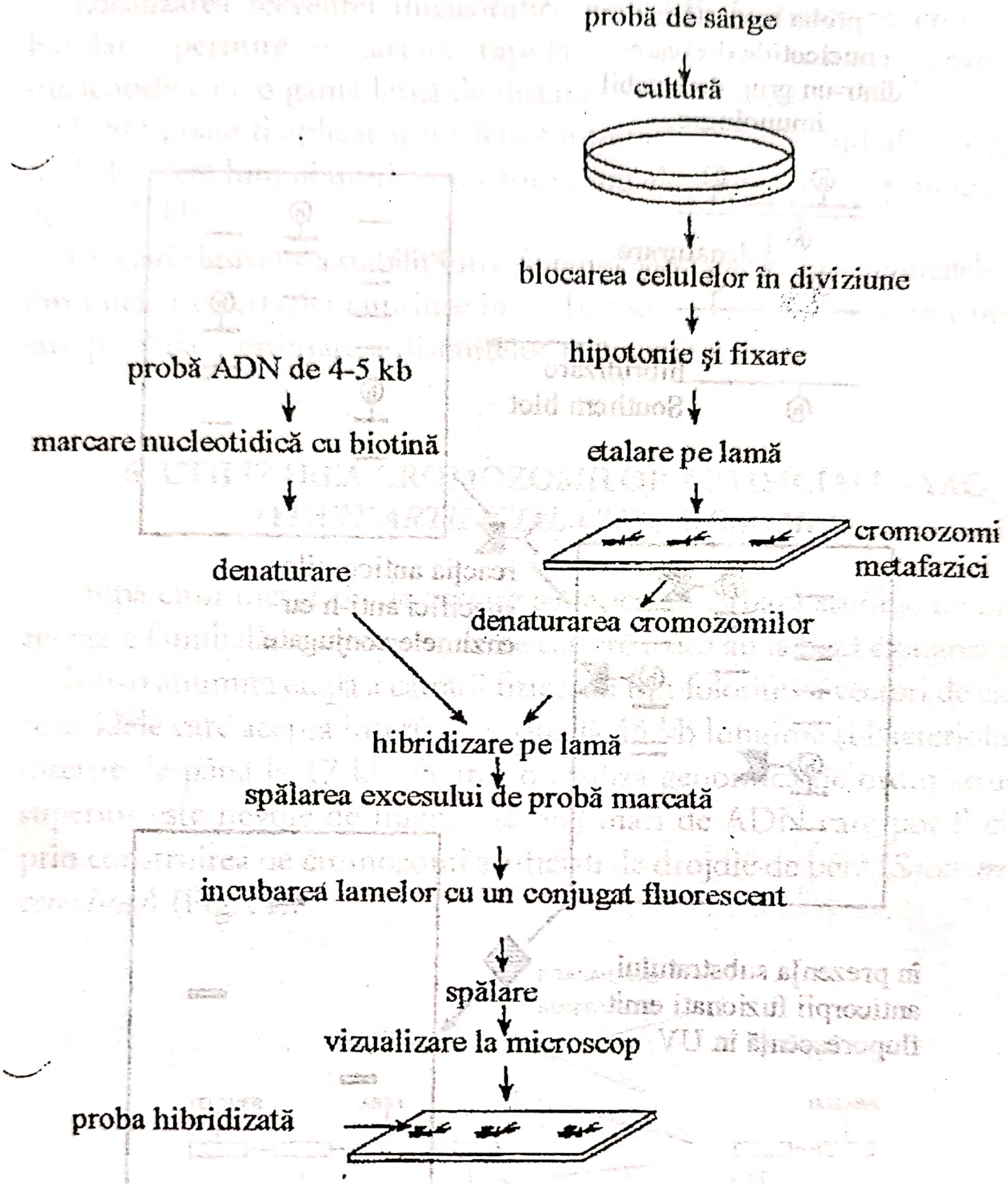


Fig. 12 — Film autoradiografic obținut după hibridizare (după Brian White, 1995)

5. HIBRIDIZAREA IN SITU PRIN FLUORESCENȚĂ (FISH)

Alături de hibridarea somatică interspecifică, hibridizarea *in situ* prin fluorescență — FISH (*fluorescence in situ hybridization*) asigură o cartare citogenetică.

Dacă proba de ADN care urmează să fie hibridizată cu cromozomi metafazici nu este marcată cu izotipi radioactivi, ci cu peptide speciale cum sunt: biotina și digoxigenina, se obține cu cea mai mare acuratețe poziția genei în cromozom. Cele doua peptide pot fi incorporate în ADN (proba de ADN), sub formă cuplată cu dUTP. Pentru vizualizarea locusului hibridizării se folosește detectarea imunocitochimică cu anticorpi antibiotină și antidigoxigenină, conjugați cu diverși fluorocromi (Fig. 13).


probă de sânge
cultură
blocarea celulelor în diviziune
hipotonie şi fixare
etalare pe lamă
cromozomi metafazici
probă ADN de 4-5 kb
marcare nucleotidică cu biotină
denaturare
denaturarea cromozomilor
hibridizare pe lamă
spălarea excesului de probă marcată
incubarea lamelor cu un conjugat fluorescent
spălare
vizualizare la microscop
proba hibridizată

HIBRIDIZARE *IN SITU* FLUORESCENTĂ

Fig. 13 a. — Hibridizarea *in situ.*

Două probe pot fi marcate diferit, una cu biotină și una cu digoxigenină si, apoi, se supune unei reacții de hibridizare. Cele doua probe vor fi detectate separat cu ajutorul fluorocromilor: rodamina (care emite

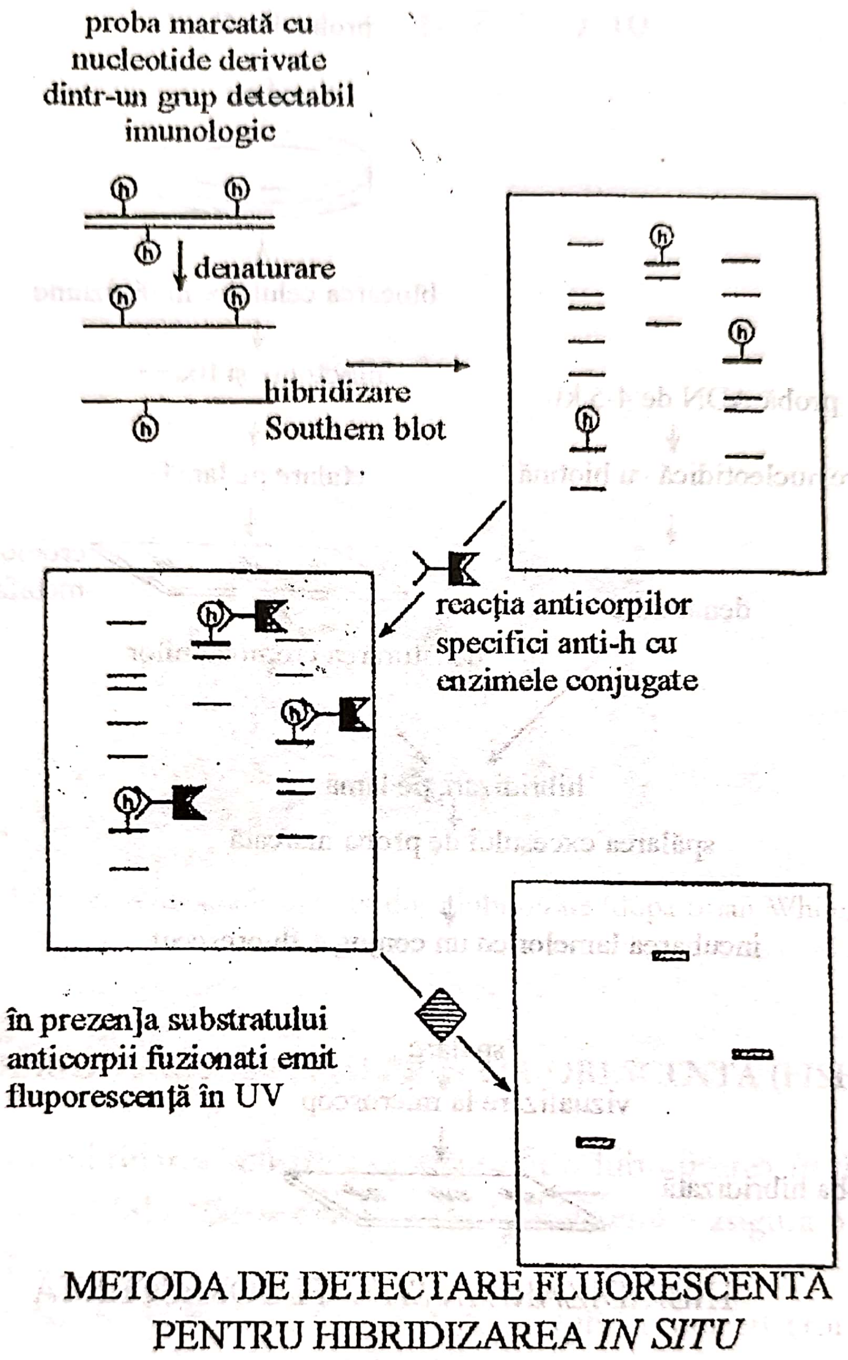

proba marcată cu
nucleotide derivate
dintr-un grup detectabil
imunologic
h
denaturare
hibridizare
Southern blot
reacţia anticorpilor
specifici anti-h cu
enzimele conjugate
în prezenţa substratului
anticorpii fuzionati emit
fluporescenţă în UV
METODA DE DETECTARE FLUORESCENTA
PENTRU HIBRIDIZAREA *IN SITU*

Fig. 13 b. — Detectarea prin fluorescenţă (FISH)

o fluorescenţă roşie în UV) şi respectiv fluoresceina (care emite o fluorescenţă verde în UV). Această tehnică este folosită pentru a decela poziţia ordonată a genelor în cromozomi, când acestea sunt separate de câteva sute de kb.

Localizarea secvenței nucleotidice prin FISH, direct pe cromozomi bandați, permite o cartare rapidă, aflându-se ordinea secvențelor nucleotidice pe o gamă largă de distanțe cromozomale.

FISH poate fi aplicat și nucleilor interfazici, permițând aflarea ordinii probelor de-a lungul unui cromozom când ele sunt separate prin mai mult de 20–30kb.

O relație liniară s-a stabilit între distanța genomică dintre semnalele FISH din nucleii interfazici cuprinse între 100 kb – 1Mb, ceea ce înseamnă că este posibilă o estimare a distanțelor intergenice.

6. UTILIZAREA CROMOZOMILOR ARTIFICIALI – YAC *(YEAST ARTIFICIAL CHROMOSOMES)*

După cum metodele de cartare genetică au la bază studiile de lincaj și agregare familială, aceste metode de cartare fizică au la bază clonarea ADN.

Într-o anumită etapă a cartării fizice, au fost folosite ca vectori de clonare: cosmidele care acceptă inserție de până la 45 kb lungime și bacteriofagii cu inserție de până la 17 kb. Pentru o analiză genomică de ordin structural superior este nevoie de fragmente mai mari de ADN care pot fi clonate prin construirea de cromozomi artificiali de drojdie de bere (*Saccharomyces cerevisiae*) (Fig.14).

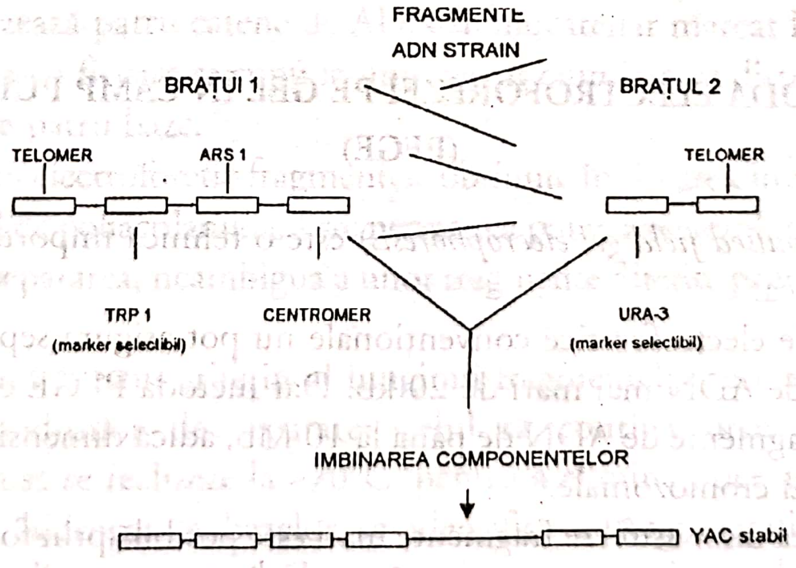

FRAGMENTE
ADN STRAIN
BRAȚUl 1
BRAȚUL 2
TELOMER
ARS 1
TELOMER
TRP 1
(marker selectibil)
CENTROMER
URA-3
(marker selectibil)
IMBINAREA COMPONENTELOR
YAC stabil

Fig. 14 — Construirea cromozomilor artificiali de drojdie (YAC)

Cromozomii conțin un centromer absolut necesar pentru atașarea la fusul de diviziune. În același timp, stabilitatea cromozomului este asigurată de structuri speciale de la extremitățile brațelor – telomere. Telomerele și centromerii cromozomilor de drojdie de bere au fost izolați prin clonare. Deoarece replicarea începe în mai multe puncte ale cromozomilor, la drojdia de bere, originile repliconilor se găsesc în niște secvențe cu replicare autonomă — ARS. De aceea, un cromozom artificial trebuie să conțină un centromer, două telomere, un ARS și doi markeri selectivi.

Se observă că la acest cromozom artificial se poate insera, lângă centromer, un fragment de ADN de până la 1.000 kb, în vederea clonării. Se obține astfel, un pseudocromozom care își menține structura liniară în celula gazdă.

Folosirea cromozomilor artificiali – YAC – a permis o creștere de 2–3 ori a dimensiunilor materialului clonabil în comparație cu materialul vehiculat de cosmide. În felul acesta, cromozomii artificiali de drojdie de bere servesc ca punți peste intervalul dintre nivelul de rezoluție megabazic al hărților genetice și limita de rezoluție de 50 kb a cosmidelor.

Se estimează că pentru cartarea întregului genom uman este necesară o bibliotecă de aproape 50.000 de YAC, cu o dimensiune medie de 1.000 kb fiecare.

Clonele YAC sunt apoi ordonate și subclonate, realizându-se seturi de clone suprapuse parțial, așezate în ordine.

7. METODA ELECTROFOREZEI PE GEL ÎN CÂMP PULSATOR (PFGE)

PFGE (*pulsed-field gel elecrophoresis*) este o tehnică importantă pentru cartarea fizică.

Tehnicile electroforetice convenționale nu pot asigura separarea unor fragmente de ADN mai mari de 20 kb. Dar metoda PFGE este capabilă să separe fragmente de ADN de până la 10 Mb, adică dimensiunea medie a unei benzi cromozomale.

Separarea unor astfel se fragmente mari este posibilă prin folosirea unor câmpuri electrice alternative care forțează fragmentele de ADN să se reorienteze în timp ce trec prin gelul de agaroză. Deoarece viteza cu care o moleculă se reorientează este o funcție a greutății sale moleculare, crește și limita de rezoluție.

Metoda PFGE este extrem de utilă în realizarea hărților de restricție ale cromozomilor.

8. ULTIMA ETAPĂ A CARTĂRII: SECVENȚIEREA NUCLEOTIDICĂ

Diferența dintre moleculele individuale de ADN este dată de secvența particulară de perechi de baze, nu de modificarea structurii.

Cum se poate determina exact o secvență de perechi de nucleotide din ADN. Este posibilă determinarea directă a unei secvențe de ADN prin două căi:

1. *calea chimică*, ce folosește reacțiile chimice de clivare a ADN în baze individuale. Stabilită de Maxam și Gilbert, metoda este simplă și riguroasă și are ca principiu fragmentarea ADN și separatea electroforetică a fragmentelor rezultăte, în funcție de mărimea lor și independent de natura bazelor, urmată de identificarea acestora (Fig. 15).

Etapele sunt:

- se marchează unul din capetele ADN clonat cu ^{32}P
- se separă cele doua catene și se izolează populația omogenă, constituită din aceeași monocatenă
- se utilizează patru catene de ADN monocatenar marcat la capatul 5' (de exemplu) și fiecare se supune unui agent chimic care distruge selectiv una din cele patru baze.
- se separă electroforetic fragmentele obținute în fiecare dintre cele patru probe pe gel de poliacrilamidă. Este necesar ca puterea de rezoluție a gelurilor să permită separarea, neambiguă a unor fragmente diferite printr-un singur nucleotid.

Impunerea acestui criteriu al lungimii fragmentelor se realizează prin alegerea condițiilor de separare: gelul să conțină uree (~8M), iar elecroforeza să se realizeze la ~70°C, pentru a elimina orice asociere prin legături de hidrogen a bazelor se identifică autoradiografic, exclusiv, fragmentele dinspre capătul 5' care au fost marcate și se indică numărul de nucleotide corespunzător fiecăreia, prin compatarea cu un etalon.

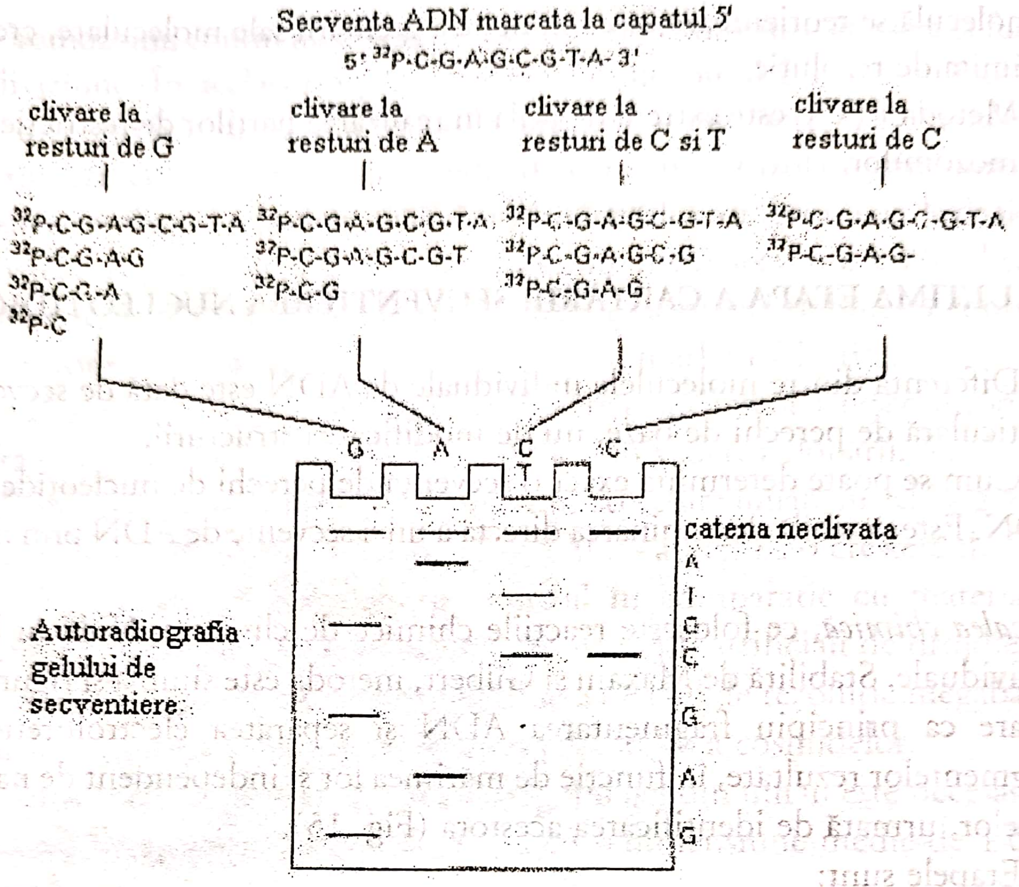

Secventa ADN marcata la capatul 5'
5' ^{32}P-C-G-A-G-C-G-T-A- 3'
clivare la resturi de G
clivare la resturi de A
clivare la resturi de C si T
clivare la resturi de C
^{32}P-C-G-A-G-C-G-T-A
^{32}P-C-G-A-G
^{32}P-C-G-A
^{32}P-C
^{32}P-C-G-A-G-C-G-T-A
^{32}P-C-G-A-G-C-G-T
^{32}P-C-G
^{32}P-C-G-A-G-C-G-T-A
^{32}P-C-G-A-G-C-G
^{32}P-C-G-A-G
^{32}P-C-G-A-G-C-G-T-A
^{32}P-C-G-A-G-
G
A
C T
C
catena neclivata
A
T
G
C
G
A
G
Autoradiografia gelului de secventiere

Fig. 15 — Metoda Maxam-Gilbert de secvențiere nucleotidică.

2. *calea enzimatică* în care ADN este sintetizat „in vitro“ în așa fel încât reacția se termină specific în poziția în care corespunde unei baze date – metoda Sanger – întreruperea controlată a sintezei prin încorporarea unor analogi structurali ai deoxiribinucleotidtrifosfaților proprii structurii ADN (Fig. 16).

Sinteza *in vitro* a catenei ADN complementară presupune prezența:

- monocatenei ADN de secvențiat, utilizată ca matriță și care provine, în general, dintr-un fragment de restricție;
- a unui primer complementar cu o mică porțiune de la capatul 3' al catenei de replicat, care se marchează cu ^{32}P. Aceasta se obține cu ușurință, ținând seama de faptul că fragmentele de restricție sunt flancate de secvențe cunoscute;
- ADN polimeraza I, din care s-a exclus regiunea cu activitate 5'-3' exonucleazică, rezultând fragmentul Klenow;

- cei patru 2'-deoxinucleotidtrifosfați: dATP, dCTP, dGTP, dTTP, dintre care cel puțin unul este marcat, mici cantități din cei patru 2'-3'-dideoxiribonucleotidtrifosfați (ddNTP), ca analogi structurali ai 2'-deoxiribonucleotidtrifosfaților (dNTP). Este ușor de imaginat că absența grupei -OH din ddNTP face posibilă continuarea sintezei ADN, în momentul în care unul dintre aceștia câștigă în competiția cu dNTP, dictat de matriță. Sinteza ADN poate fi, deci, întreruptă prematur și întâmplător, la oricare dintre resturile nucleotidice.

Pentru a determina secvența de nucleotide, ADN este supus unei serii de patru reacții separate, fiecare reacție fiind specifică pentru una dintre baze. Prin electroforeză, produșii de reacție vor migra în patru benzi paralele, în același gel. Banda corespunzatoare unei lungimi particulare apare numai în una din cele patru benzi. Baza indică nucleotidul prezent în poziția corespunzatoare în ADN. Urmărind bandă cu bandă, serii de nucleotide pot fi citite potrivit culoarului în care apar benzile. Aceasta arată secvența de ADN.

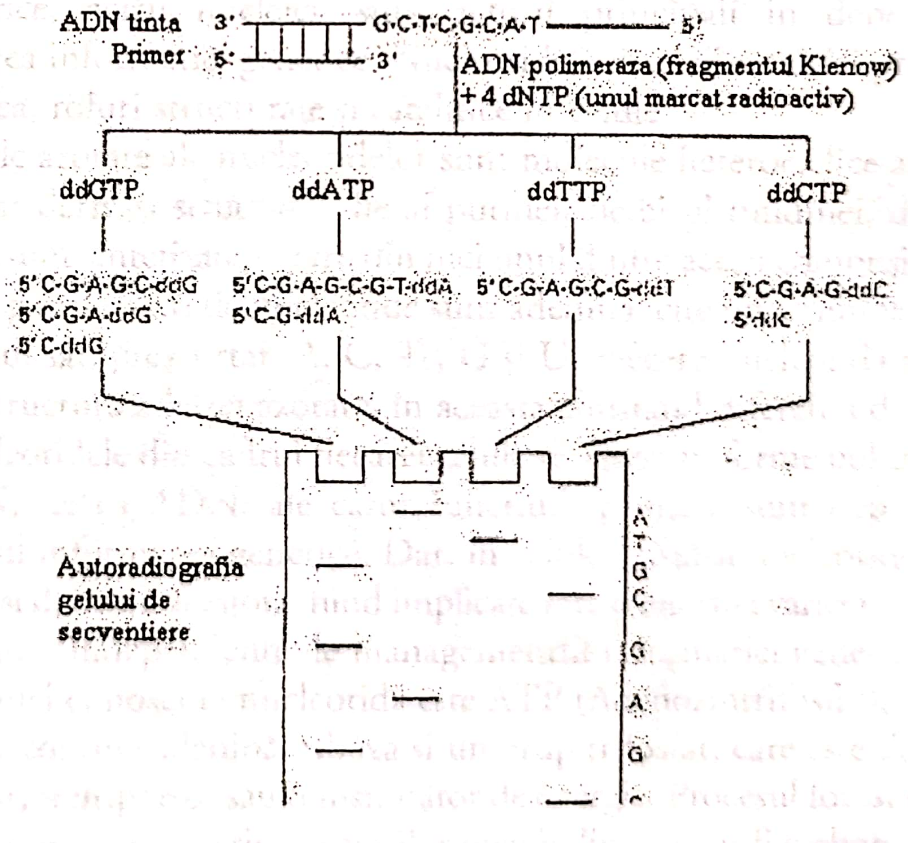

ADN tinta 3' G-C-T-C-G-C-A-T 5'
Primer 5' 3'
ADN polimeraza (fragmentul Klenow)
+ 4 dNTP (unul marcat radioactiv)
ddGTP
ddATP
ddTTP
ddCTP
5' C-G-A-G-C-ddG
5' C-G-A-ddG
5' C-ddG
5' C-G-A-G-C-G-T-ddA
5' C-G-ddA
5' C-G-A-G-C-G-ddT
5' C-G-A-G-ddC
5' ddC
Autoradiografia gelului de secventiere
A
T
G
C
G
A
G

Fig. 16 — Metoda Sanger de secvențiere nucleotidică.

CAPITOLUL VI

DISECȚIA MOLECULARĂ A ACIZILOR NUCLEICI

1. STRUCTURA ȘI FUNCȚIA NUCLEOTIDELOR

Nucleotidele sunt unele din cele mai versatile componente moleculare ale celulelor vii, în special, pentru rolul acestora în menținerea și propagarea vieții.

Nucleotidele participă specific la transferul energetic, iar formele lor polimerice, acizii nucleici, sunt actorii principali în depozitarea și decodarea informației genetice. Nucleotidele și acizii nucleici prezintă, de asemenea, roluri structurale și catalitice în celule.

Bazele azotate ale nucleotidelor sunt molecule heterociclice aromatice, care sunt derivați structurali fie ai purinei, fie ai pirimidinei, deși aceste baze nu sunt sintetizate *in vivo* din nici unul dintre acești compuși organici.

Cele patru tipuri de nucleotide sunt adenina, citozina, timina, guanina și uracilul sau prescurtat A, C, T , G și U. Fiecare nucleotidă are un alt tip de structură a bazei azotate, în aceasta constând diferența dintre ele.

Nucleotidele din cadrul fiecărei celule se găsesc în forme polimerice, fie ca ARN, fie ca ADN, ale căror funcțiuni primare sunt depozitarea și transferul informației genetice. Dar, în celule există și nucleotidele libere, precum și derivații acestora, fiind implicate într-o enormă varietate de funcții metabolice, independente de managementul informației genetice.

Cea mai cunoscută nucleotidă este ATP (Adenozintrifosfat), o nucleotidă care conține adenină, riboză și un grup trifosfat, care este deopotrivă depozitar, transportor sau transmițător de energie. Procesul fotosintezei sau al ruperii/descompunerii compușilor metabolici cum ar fi carbohidrații sau acizii grași, duc la formarea ATP-ului din ADP (Adenozindifosfat). ATP difuzează în celulă și furnizează energie pentru alte procese celulare, cum ar fi reacții biosintetice, transport ionic și mișcarea celulară. Energia ATP-ului este pusă la dispoziție când unul (sau două) dintre grupurile sale fosfat sunt transferate altei molecule. Acest proces este reprezentat prin hidroliza ATP-ului la ADP.

În ciuda enormei variații în metabolismul energetic al diferitelor organisme, anumiți derivați nucleotidici sunt predominanți. Printre acestia se numară FAD (*Flavin Adenină Nucleotidul*), NAD (*Nicotin Amida Nucleotidul*) și CoA (*Coenzima A*). Acești compuși joacă un rol central în metabolism, prin participarea lor la multe reacții biologice de oxido-reducere.

2. GEOMETRIA ADN-ULUI

Acizii nucleici pot adopta diferite conformații:

- **ADN-B** se găsește în soluții saline slab concentrate. Este forma nativă care apare în cromatină.
- În soluții cu concentrații saline mai mari sau prin adăugare de alcool întâlnim **ADN-A**.
- **ADN-Z** apare în secvențe alternante de poli(dG-dC), în soluții cu mari concentrații saline sau alcoolice.
- **ARN** apare (spre deosebire de ADN) aproape exclusiv în conformații A (sau asemănătoare formei A).
- Există conformații ale acizilor nucleici cum ar fi ADN-C, ADN-H sau altele, care sunt însa mai rar întalnite.

Parametrii geometrici:

Parameterii	**Forma A**	**Forma B**	**Forma Z**
Direcția de rotire a helixului	Dreapta	**Dreapta**	Stânga
Legătura glicozidică	anti	**sin**	Anti – Pirimidină Sin – Purină
Conformația furanozei	C3` endo	**C2` endo**	C2`endo – Pirimidina C3` endo – Purina
Resturi per tur de helix	11	**10**	12 perechi de baze

Unghiul de rotație al perechilor de baze (în grade)	33	**36**	-30
Distanța dintre două perechi de baze de-a lungul helixului (Å)	2.6	**3.4**	3.7
Pasul la o rotire completă a helixului (Å)	28	**34**	45
Înclinarea bazelor față de axa helixului (în grade)	20	**6**	7
Adâncitura majora (Fig. 10)	strâmtă și adâncă	**largă și adânca**	plată
Adâncitura minoră	largă și puțin adâncă	**strâmtă și adâncă**	strâmtă și adâncă

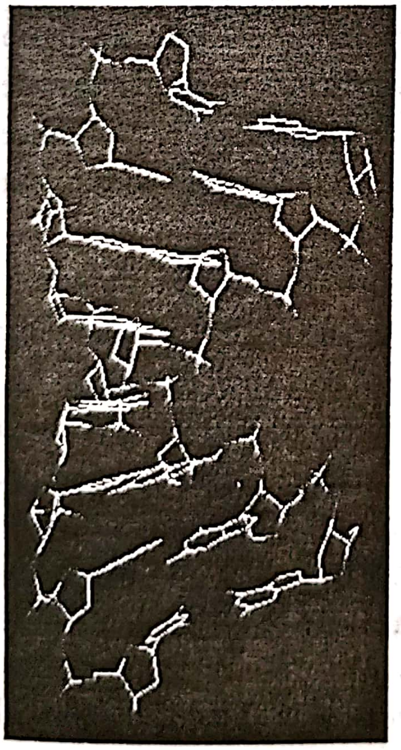


Fig. 1.a

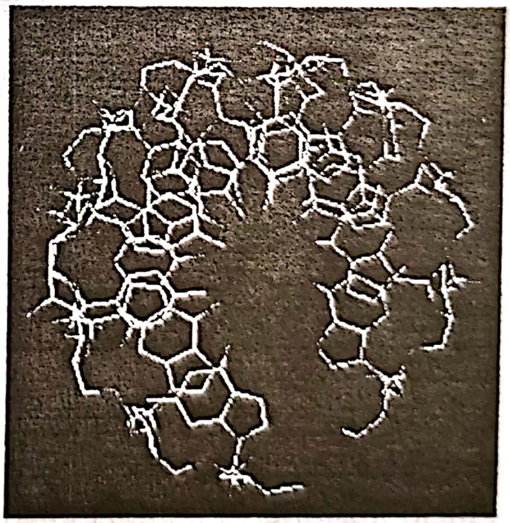


Fig. 1.b

- **ADN-A**
  - Fig. 1.a. Prezintă helixul ADN-A din lateral. Perechile de baze sunt înclinate față de axa helixului. Cele mai multe perechi de baze sunt aproape planare. A se observa că perechile de baze sunt pe jumătate de-a lungul helixului. Din această perspectivă, se poate vedea că perechile de baze nu sunt centrate pe axa helixului, ci sunt împinse către exterior. Adâncitura majoră (dreapta) este foarte adâncă, în timp ce adâncitura minoră (stânga) este foarte puțin adâncă.
  - Fig.1.b ne arată helixul ADN-A în secțiune transversală. De observat „gaura" larga din centru care se datoreaza faptului că atomii perechilor de baze sunt împinși către exterior.

Nu este încă clar dacă conformația ADN-A există *in vivo*, oricum, ori de câte ori moleculele de ARN formează dublu helix (fie ca hibrizi ARN:ARN sau ARN:ADN) aceștia adoptă conformația A.

- **ADN-Z**

În 1979, Alex Rich și colegii săi de la MIT (SUA) au reușit să cristalizeze o dublă-catenă a hexanucleotidei CGCGCG. Analiza lor a constituit o surpriză: cristalele analizate au arătat că această moleculă aparte adoptă o conformație sub formă helicală cu spiralizare spre stânga. Bazele adoptă o conformație sin și nu obișnuită anti, de unde rezultă că unitățile care se repetă în această structură sunt perechi de baze dinucleotidice. Deoarece coloana glucidofosforică are forma de zig-zag , această conformație a fost numită ADN-Z.

Fig. 2.1 Este o imagine tipica a ADN-Z, văzută din lateral. Perechile de baze sunt aproape planare și ocupă centrul helixului.Urmărind coloanele glucidofosforice, observăm că acestea prezintă spiralizare spre stânga. In fig. 2.2 sunt marcați numai atomii coloanei glucidofosforice. Superhelicitatea de stânga a helixului este evidentă urmărind structura de zig-zag a coloanei glucidofosforice. Fig. 2.3 este identică cu prima numai ca axa helixului este ușor înclinată către privitor. A se observa bazele guaninei din partea de jos a catenei stângi. Astfel, se vede clar ca planul bazei de guanină se extinde peste planul atomilor dezoxiribozei – cu alte cuvinte este conformatie sin. Fig. 2.4 este o vedere de sus a secțiunii transversale a dublului helix al

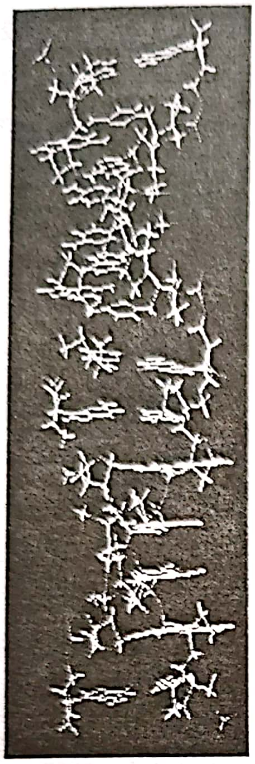


Fig.2.1

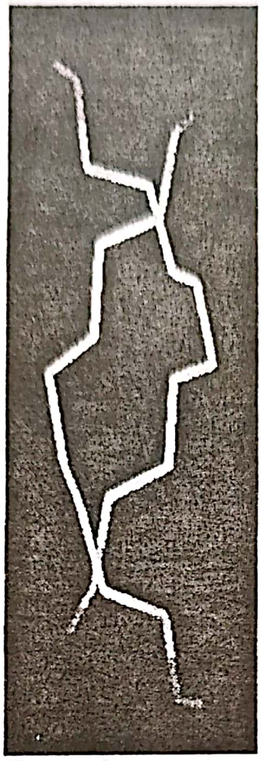


Fig.2.2

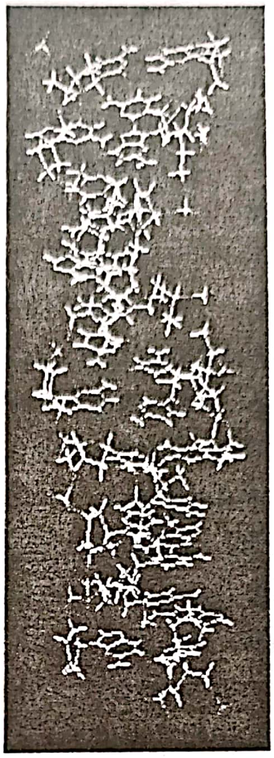


Fig.2.3

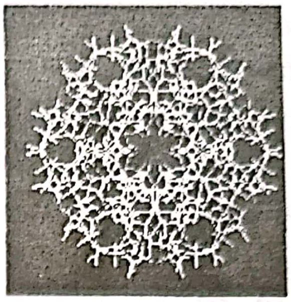


Fig.2.4

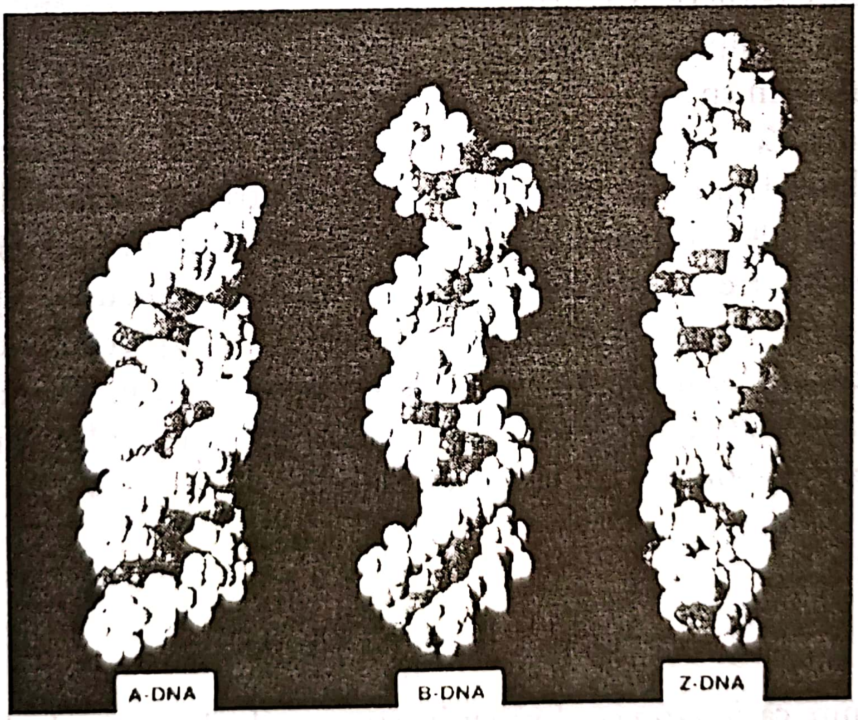

A-DNA
B-DNA
Z-DNA

Fig. 3

ADN-Z. Spre deosebire de helixul de mai sus al ADN-A, perechile de baze sunt centrate și în jurul axei helixului, centrul helixului fiind în acest caz ocupat.

Conformația ADN-Z pare să se formeze cel mai des în secvențe ce alternează purinele și pirimidinele, în particular alternând citozinele și guaninele.

O comparație a vederii frontale și transversale între ADN-A, B și Z este redată în figura 4.

În **forma A**, există un mare spațiu în centru, mărginit de baze, în timp ce coloana glucidică este situată către exterior.

În **forma B**, bazele sunt centrale, urmate de deoxiriboze și fosfați către periferie. Centrul helixului este umplut cu baze, nelăsând nici un spațiu.

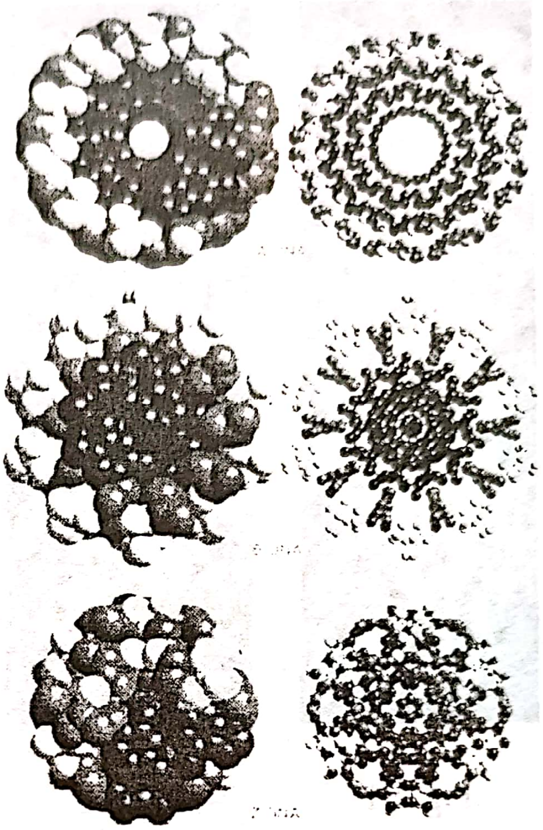


Fig. 4 — Formele A, B, și Z ale ADN, în vedere frontală și transversală.

În **forma Z,** bazele sunt prezente pe toată suprafața, neexistând un domeniu bine definit nici pentru baze și nici pentru componentele coloanei glicofosforice. De fapt, trebuie subliniat că în ADN-Z, fosfații și furanozele se orientează către centrul helixului, în timp ce bazele sunt dispuse către exterior, acest aspect contribuind la reactivitatea/predispunerea către mutagenicitate a formei Z. Aceasta explică și faptul că forma Z are adâncitură minoră foarte adâncă, în timp ce domeniul corespunzator adânciturii majore este o suprafață convexă, în formă de zig-zag.

3. FLEXIBILITATEA ADN

Se admite că *in vitro* conformațiile structurale distincte ale ADN A, B și Z nu suferă interconversie. Tranziția de la o formă la alta presupune schimbări fizice de mediu (de exemplu umiditate scazută) sau influența unor proteine de legătură. In afară de aceasta, adevăratele molecule de ADN diferă de structurile ideale prezentate mai sus. Analizele structurale cu raze X ale segmentelor de ADN-B dezvăluie faptul că reziduurile individuale sunt departe de o conformație medie, într-o relație ce depinde de elementele componente ale secvenței.

Fiecare pereche de baze deviază deci de la conformația ideală, prin răsucire ca o paletă a unei elice. Astfel de variații conformaționale sunt foarte importante pentru recunoașterea secvențelor specifice ale ADN de către proteinele ce procesează informația genetică.

Helixul ADN poate adopta diferite grade de răsucire/îndoire, care sunt, de fapt, imperative pentru a putea fi împachetat în celulă. Flexibilitatea conformațională a ADN este limitată. Conformația unei unități de nucleotidă este specificată de șase unghiuri de torsiune ale legăturii glicofosforice și de unghiul de torsiune ce definește orientarea bazelor în jurul legăturii glicozidice – punctul C1` (fig. 5).

Rotația unei baze în jurul legăturii sale glicozidice (unghiul *X*) este restrânsă. Resturile purinelor și pirimidinelor prezintă două orientări sterice

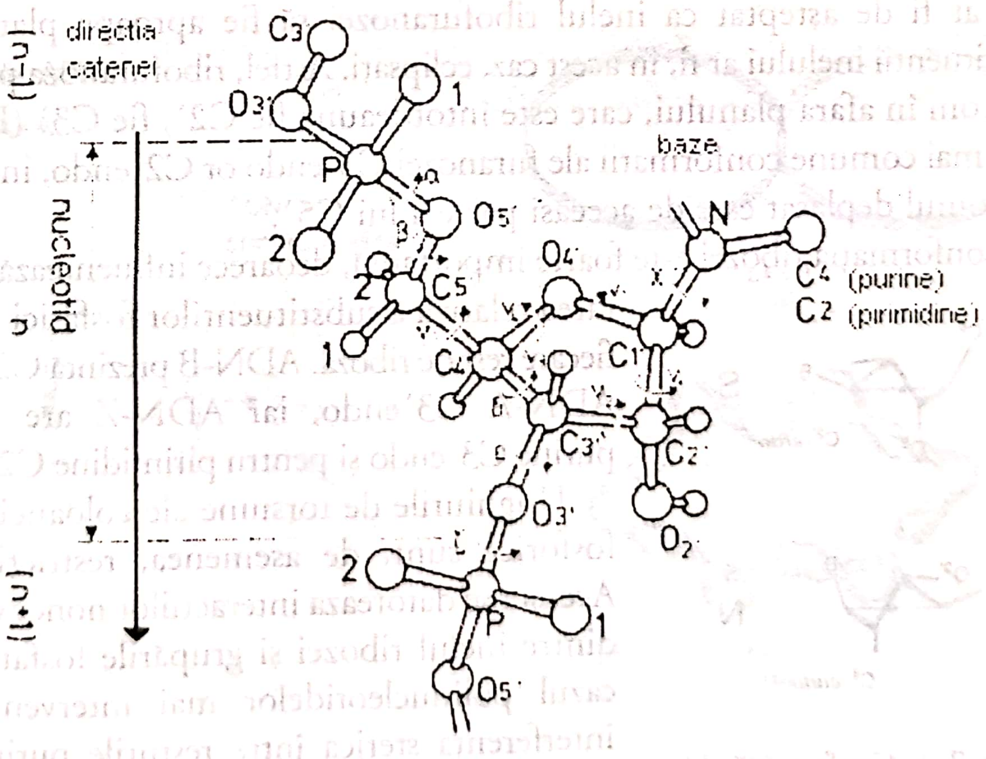
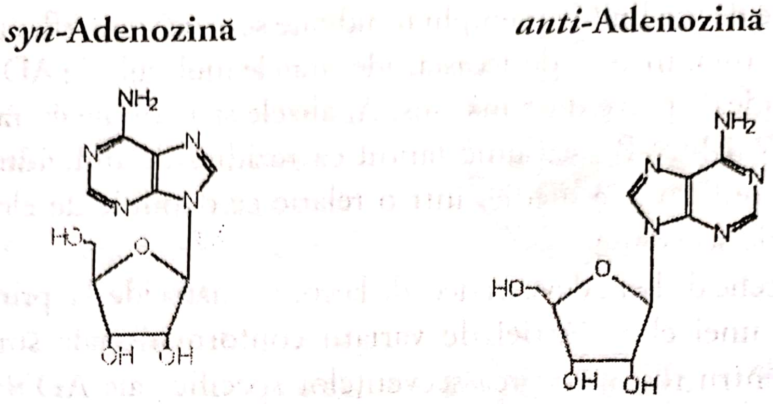


Fig. 5 — Orientarea bazelor în jurul legăturii glicozidice.



syn-Adenozină

anti-Adenozină

Fig. 6 — Conformații *sin* și *anti*.

posibile, cunoscute sub denumirea de conformații *sin* și *anti* (fig. 6). Numai conformațiile *anti* ale pirimidinelor sunt stabile deoarece, în conformația *sin*, restul de furanoză interferă cu substituentul C2 al pirimidinei. Conformația ***anti*** este cea care predomină în nucleotidele ce apar natural. Excepția o constituie ADN-Z, în care resturile alternante ale pirimidinelor și purinelor au conformații *sin* și *anti.* Flexibilitatea inelului furanozei este, de asemenea, limitată. Unghiurile vertex ale unui pentagon regulat au 108^0, deci ar fi de așteptat ca inelul ribofuranozei să fie aproape plat. Însă, substituenții inelului ar fi, în acest caz, eclipsați. Astfel, ribofuranoza prezintă un atom în afara planului, care este întotdeauna fie C2`, fie C3` (Fig. 7). Cele mai comune conformații ale furanozei C3`endo or C2`endo, indicând că atomul deplasat este de aceeași parte a lui C5`.

Conformația ribozei este foarte importantă, deoarece influențează orientarea relativă a substituenților fosfatici pentru fiecare rest de riboză. ADN-B prezintă C2`endo, ADN-A C3`endo, iar ADN-Z are pentru purine C3`endo și pentru pirimidine C2`endo.

Unghiurile de torsiune ale coloanei glicofosforice sunt, de asemenea, restricționate. Aceasta se datorează interacțiilor noncovalente dintre inelul ribozei și grupările fosfatice, în cazul polinucleotidelor mai intervenind și interferența sterică între resturile purinice și pirimidinice.

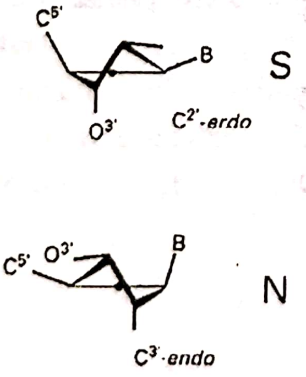


Fig. 7 — Conformații ale inelului furanozic.

4. SUPERHELICAREA ADN

Anumite molecule de ADN viral au forma unor cercuri închise. În ADN circular, cele două catene se rotesc una în jurul celeilalte, în forma unei structuri de dublu helix, circular covalent închis (Fig. 8).

Apariția ADN sub forma unor cercuri închise a dus la o complexitate adițională a vizualizării structurii acestuia. Cercurile nu sunt monodimesionale, ci lanțuri tridimensionale care se încolăcesc unul în jurul celuilalt, care se deformează ca și un cerc făcut din sfoară, răsucindu-se și formând superhelixuri.

Studii teoretice au arătat că superspiralizarea ADN generează o varietate de topologii. Topologia superspiralizării poate fi descrisă după cum urmează:

Se consideră o moleculă de ADN dublu-catenară, în care fiecare din cele două catene sunt unite covalent, pentru a forma o moleculă circulară dublucatenară. Proprietatea geometrică a unui asemenea ansamblu este accea că numărul de răsuciri nu poate fi alterat, fară a tăia cel puțin una din catenele polinucleotidului (Fig. 9).

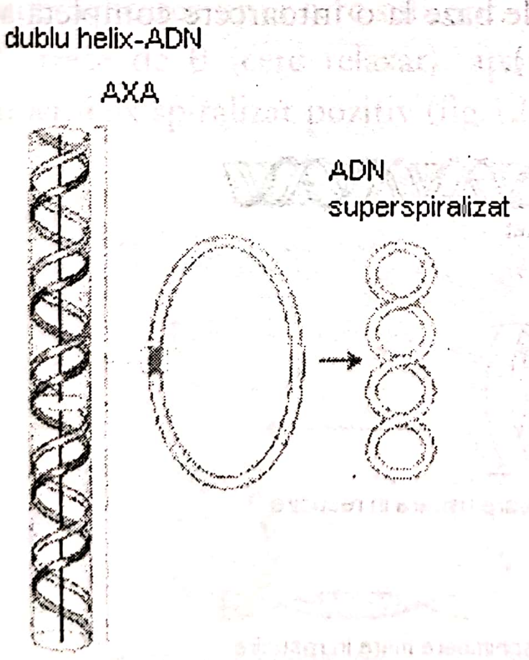


Fig. 8 — Superhelicarea duplexului circular ADN.

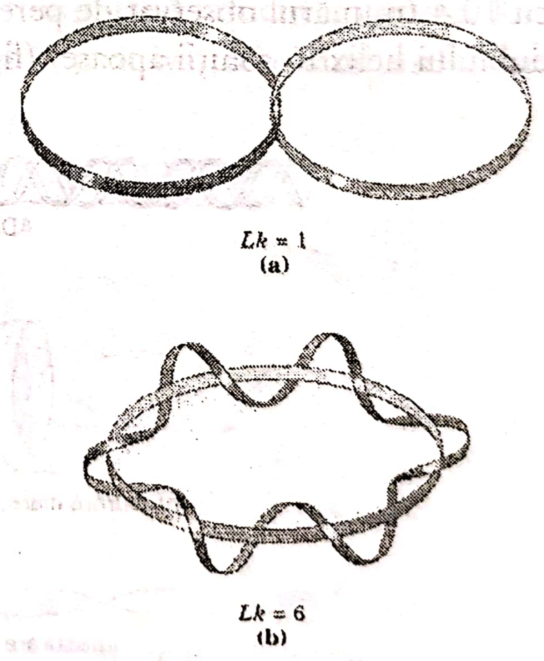


Fig. 9 — Modificarea superhelicării prin crestare *(nicking)* monocatenară.

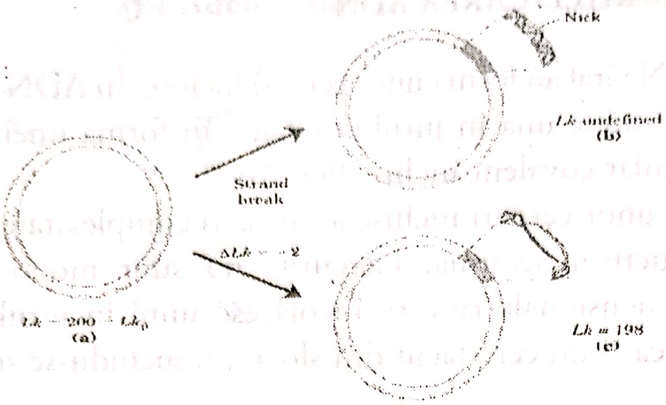
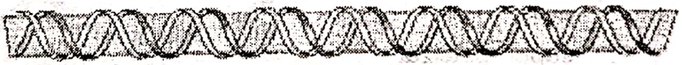


Fig. 10 — Număr de legătură (L).

Fenomenul este exprimat matematic ca: L=T+W în care

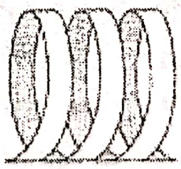
L = număr de legătură, arată de câte ori o catenă de ADN se învârte în jurul celeilalte (fig. 10). Acest număr este cel mai ușor de determinat atunci când molecula este proiectată în plan. Numărul de legătură nu poate fi schimbat prin răsucirea sau distorsionarea moleculei, atâta vreme cât catenele polinucleotidului ramân covalent intacte.

T = Întoarcerea. Aceasta este numărul complet de răsuciri pe care o catenă polinucleotidică o face în jurul axei duplexului. Prin convenție, T este pozitiv pentru duplexurile care se rotesc către dreapta, asa fel încât, pentru ADN-B, întoarcerea este de fapt numărul de perechi de baze divizat cu 10,4 (numărul observat de perechi de baze la o întoarcere completă a dublului helix in soluții apoase) (fig. 11).



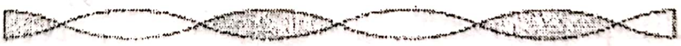
ADN relaxat

(a)



infasurare mare, schimbare usoara in rasucire

(b)



infasurare zero, schimbare mare in rasucire

(c)

Fig. 11 — Întoarceri (T) ale dublului helix-ADN.

W = numărul de răsucire, reprezintă numărul de răsuciri pe care axa duplexului o face in jurul axei superhelixului (fig. 12). Acest parametru este măsura superhelicării ADN. Din moment ce L este constant pentru un cerc intact de ADN dublucatenar, pentru fiecare nouă răsucire a dublului helix trebuie să avem un număr egal și opus de răsucirii superhelicale, asa încât ΔW = - ΔT.

Superspiralizarea ADN este relaxată prin tăierea unei catene

ADN superspiralizat poate fi convertit la cercuri relaxate prin tratamentul cu DN-aza I pancreatică, o endonuclează care taie numai o catenă a duplexului ADN. O singură tăiere a catenei este suficientă pentru a relaxa un ADN superspiralizat.

Cercurile de ADN care apar în natură sunt subrotite

Numărul de legătură al cercurilor de ADN natural este mai mic decât al acelora ce corespund cercurilor relaxate; aceasta înseamnă că sunt subrotite. Oricum, deoarece ADN tinde să adopte o conformație generală, care să mențină răsucirea sa normală de o întoarcere /10.4 bp, molecula este superspiralizată negativ (W<0). Dacă duplexul este rotit (dacă T descrește), atunci W crește (L trebuie să rămână constant). Inițial aceasta reduce superhelicarea unui cerc subrotit. Însă, continuând răsucirea, valoarea lui W trece de 0 (cerc relaxat), apoi devine pozitivă, rezultând astfel un superhelix spiralizat pozitiv (fig.12).

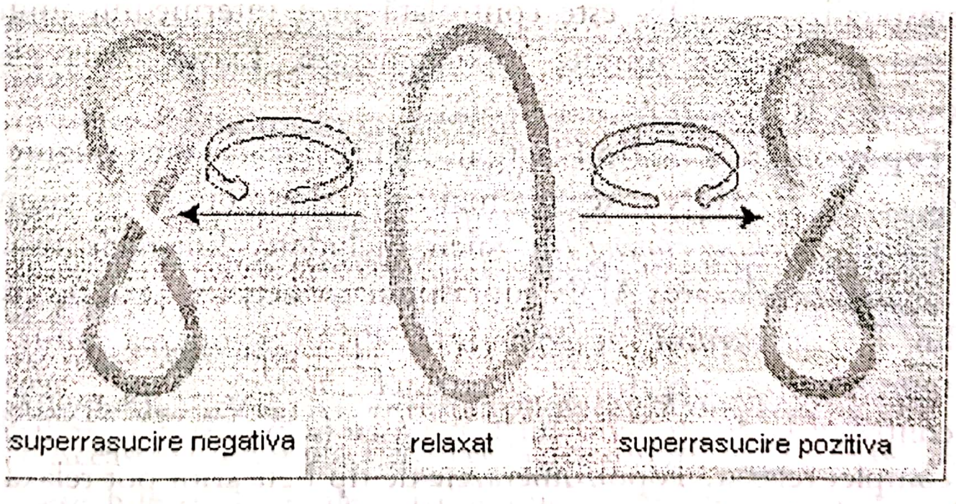


Fig. 12 — Tipuri conformaționale de ADN circular covalent închis.

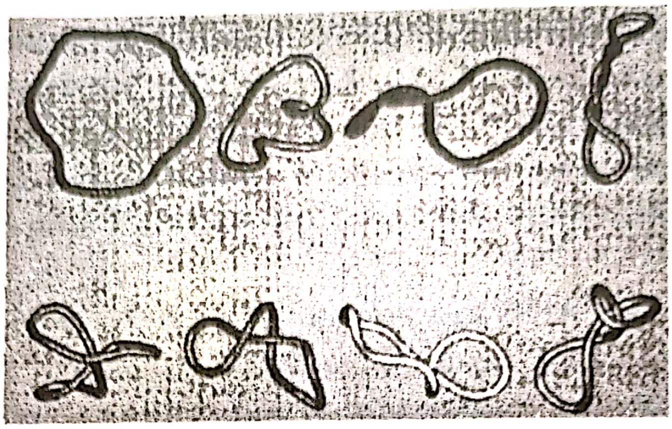


Fig. 13 — Câteva forme de superspiralizare.

5. TOPOIZOMERAZELE CONTROLEAZĂ SUPRASPIRALIZAREA ADN

ADN supraspiralizat negativ are o stare de energie înaltă. Astfel molecula se află sub stress (*„stress topologic“, „stress superhelical“*). Fenomenele biologice care ajută la ușurarea acestui stress vor fi favorizate. ADN supraspiralizat negativ este forma sa naturală din celulele vii. Deoarece dezrăsucirea ADN reduce stressul superhelical, dezrăsucirea este și o cerință pentru procesele replicării și transcripției.

Dacă duplexul ADN îi lipsește tensiunea superhelicală necesară, procesele vitale menționate anterior nu se mai pot desfășura.

Supraspiralizarea ADN este controlată prin intermediul unui grup remarcabil de enzime numite topoizomeraze. Există doua clase de topoizomeraze la procariote și eucariote.

1. **Topoizomeraze de tip I** (acționează prin crearea unei singure ruperi de catenă în ADN). Acestea mai sunt cunoscute și sub numele de enzime *„nicking-closing“*/de tăiere-închidere. Enzimele procariote catalizează relaxarea ADN supraspiralizat negativ, prin descreșterea lui L (numărului de legătura). Prin expunerea unui ADN supraspiralizat negativ la o enzimă *„nicking-closing“*, aceasta va contribui la descreșterea lui L până ce helixul supraspiralizat va fi complet relaxat. Topoizomerazele de tip I eucariot pot relaxa ADN supraspiralizat atât negativ cât și pozitiv.

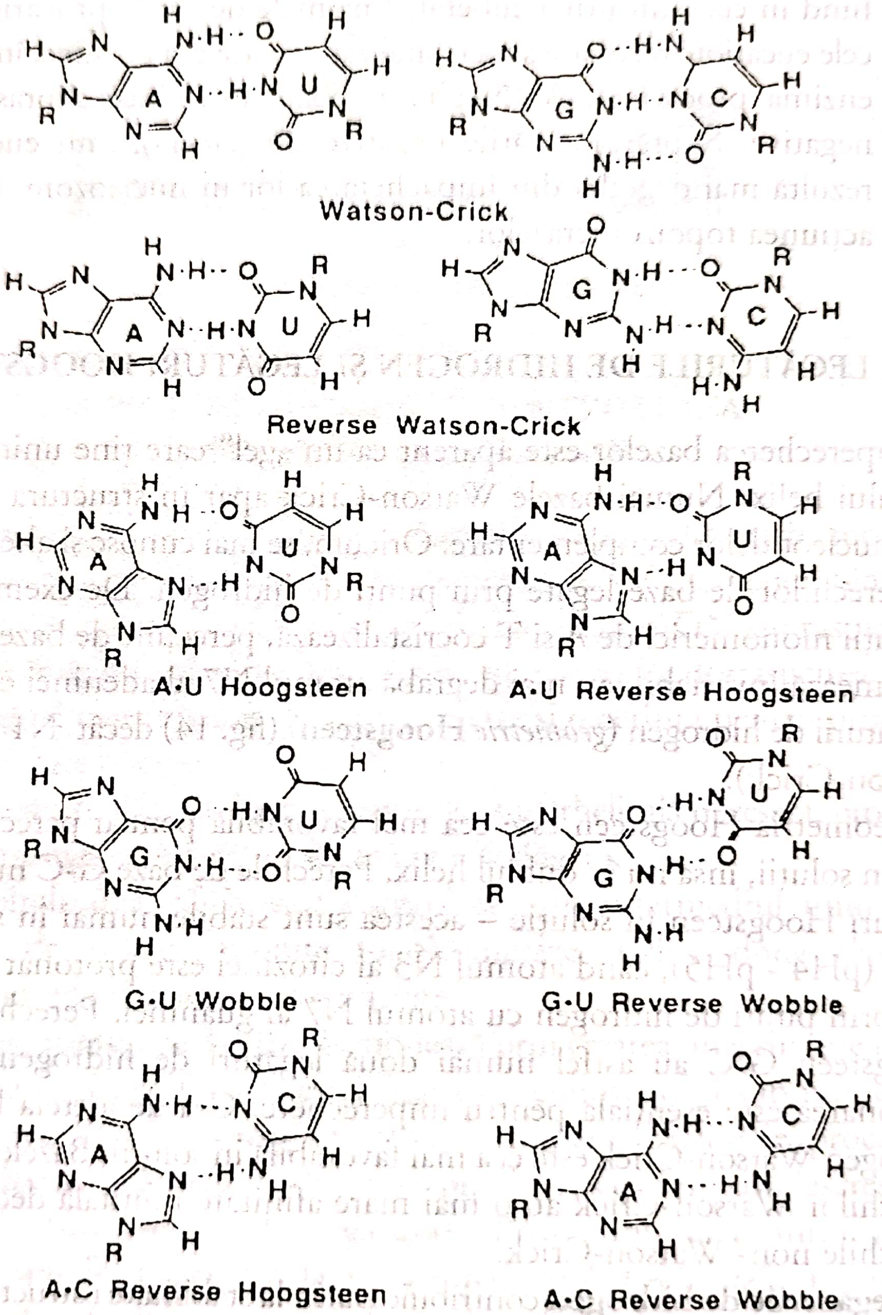
2. **Topoizomeraze de tip II** acționează prin crearea unei duble ruperi de catene în ADN. Acestea sunt enzime multimerice care cer hidroliza ATP pentru a completa un ciclu de reacție în care două catene de ADN sunt crestate, duplexul ADN este trecut prin taietură, acesta fiind în cele din urmă eliberat. Enzimele de tip II procariote cât și cele eucariote relaxează superspiralizări negative și pozitive, însă numai enzima procariotă, ADN giraza, poate introduce supraspiralizări negative. Supraspiralizările negative din cromozomii eucariotelor rezultă mai degrabă din împachetarea lor în nucleozom, decât din acțiunea topoizomerazelor.

6. LEGĂTURILE DE HIDROGEN ȘI LEGĂTURI HOOGSTEEN

Împerecherea bazelor este aparent ca un „gel“ care ține unite catenele dublului helix. Numai bazele Watson-Crick apar în structura cristalelor oligonucleotidelor complementare. Oricum, se mai cunosc și alte geometrii ale perechilor de baze legate prin punți de hidrogen. De exemplu, când derivații monomerici de A și T cocristalizează, perechile de baze A-T, care se formează invariabil, au mai degrabă atomul N7 al adeninei ca acceptor al legăturii de hidrogen (*geometrie* **Hoogsteen**) (fig. 14) decât N1 (geometrie Watson-Crick).

Geometria Hoogsteen este cea mai favorabilă pentru perechi de baze A-T în soluții, însă nu în dublul helix. Perechile de baze G-C nu formează legături Hoogsteen în soluție – acestea sunt stabile numai în soluții slab acide (pH4 - pH5), când atomul N3 al citozinei este protonat și se poate lega prin punți de hidrogen cu atomul N7 al guaninei. Perechile de baze Hoogsteen G-C au astfel numai două legături de hidrogen, de aceea protonarea este esențială pentru împerechere. Cea de a treia legătură de hidrogen Watson-Crick este cea mai favorabilă in soluții. Bazele din cadrul perechilor Watson-Crick au o mai mare afinitate mutuală decât cele din perechile non- Watson-Crick.

Legăturile de hidrogen contribuie puțin la stabilitatea structurii acizilor nucleici. Aceasta se întâmplă, deoarece la denaturare, legăturile de hidrogen dintre perechile de baze ale acizilor nucleici naturali sunt înlocuite de legăturile de hidrogen echivalente energetic dintre baze și apă.



Watson-Crick

Reverse Watson-Crick

A·U Hoogsteen

A·U Reverse Hoogsteen

G·U Wobble

G·U Reverse Wobble

A·C Reverse Hoogsteen

A·C Reverse Wobble

Fig. 14 — Legături „clasice" Watson-Crick și legături Hoogsteen, în structura macromoleculelor ADN.

7. FORȚE DE STIVUIRE ȘI INTERACȚII HIDROFOBE

Purinele și pirimidinele tind să formeze îngrămădiri extinse de molecule paralele planare. Aceasta a fost observată în structurile acizilor nucleici și ale bazelor cristalizate în acizii nucleici. Interacțiile de stivuire sunt o formă a interacțiilor de tip van der Waals. Interacțiile dintre bazele G și C sunt mai mari decât cele dintre A și T, ceea ce explică în mare masură stabilitatea termică mai mare a ADN cu conținut ridicat în G+C. Diferite porțiuni de baze împerecheate au diferite energii de stivuire. Astfel, energia de stivuire a dublului helix este dependentă de secvența acestuia.

Interacțiile de stivuire în soluții apoase se datorează forțelor hidrofobe. Interacțiile hidrofobice în acizii nucleici nu sunt similare acelora ce stabilizează structura proteinelor. Măsurători termodinamice au arătat că forțele de stivuire în acizii nucleici se supun entalpiei și se opun entropiei. Aceste diferențe între forțele hidrofobe în proteine și acizii nucleici reflectă faptul că bazele acizilor nucleici sunt mult mai polare decât majoritatea lanțurilor proteinice. Acest fenomen nu a fost încă explicat teoretic. Indiferent de originea lor, forțele hidrofobe sunt de importanță centrală în determinarea structurii acizilor nucleici, după cum este clar din efectul denaturant în urma adăugării de solvenți nepolari soluțiilor apoase de ADN.

8. INTERACȚIILE IONICE

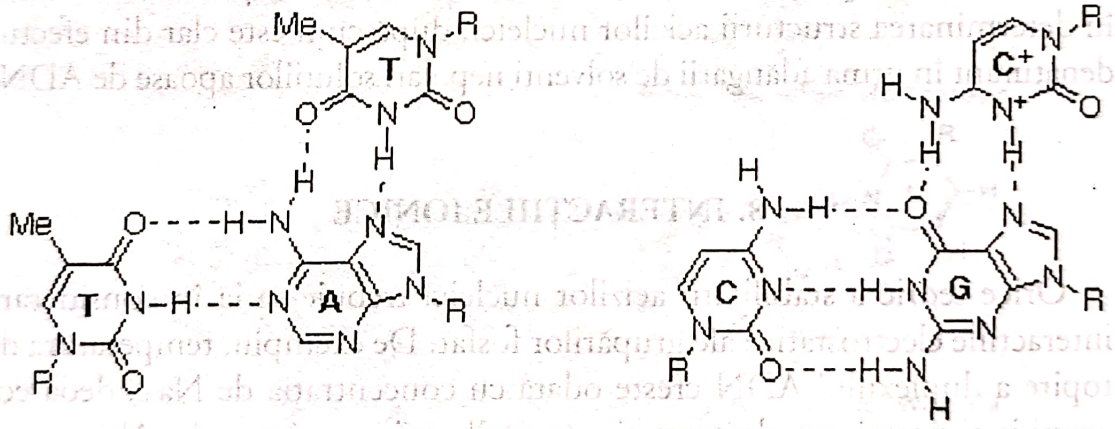
Orice teorie a stabilității acizilor nucleici trebuie să ia în considerare interacțiile electrostatice ale grupărilor fosfat. De exemplu, temperatura de topire a duplexului ADN crește odată cu concentrația de Na+, deoarece acești ioni protejează electrostatic grupările anionice între ele. Alți cationi monovalenți, cum ar fi Li^+ și K^+, au interacții nonspecifice similare cu grupările fosfat. Cationii divalenți ca Mg^{2+}, Mn^{2+} și Co^{2+}, dimpotrivă, se leagă specific de grupările fosfat, deci sunt agenți protectori ai acizilor nucleici mult mai eficienți decât cationii monovalenți.

9. TRIPLUL HELIX

Un duplex ADN pirimidinic/purinic poate interacționa cu o altă catenă pirimidinică în a forma un complex stabil. Noua catenă pirimidinică se localizează paralel cu cea purinica a duplexului, interacționând cu aceasta prin intermediul legăturiilor de hidrogen și conform geometriei Hoogsteen. Condiția este ca perechile de baze A-T din duplex să fie recunoscute de T din ce de-a treia catenă, în timp ce perechile de baze C-G să fie recunoscute de C protonată.

5'-TTTCTTCTTCT	legătură de H (Watson-Crick) în catena pirimidinică
AAAGAAGAAGA-5'	catena purinică
TTTCTTCTTCT-5'	legătură H (Hoogsteen) în catena pirimidinică

(C=citozină protonată)



Triplet TAT **Triplet CGC$^+$**

Fig. 15 — Alinierea catenei și condiția de recunoaștere în structuri triplex polideoxiribonucleotidice.

În anul 1974, a fost propusă structura tridimensională a triplexului ADN (fig. 16), pe baza datelor de difracție a razelor X.

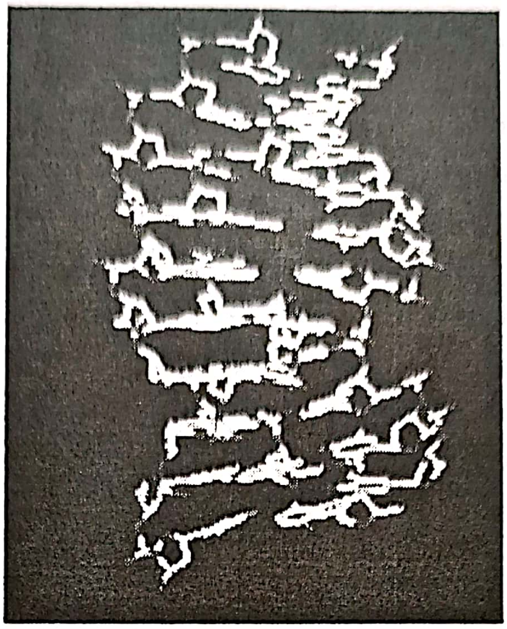


Fig. 16 — Model tridimensional al unui triplex ADN.

Caracteristica acestui model este aceea că planul celor trei baze este înclinat către axa helixului , perechile de baze Watson-Crick fiind distanțate cu mai mult de 3.5 angstromi de axă, conformația furanozei fiind C3'-endo.

Aceste caracteristici sunt similare cu cele ale modelului A al duplexului, de aceea ne referim la modelul A al triplexului, deși în multe alte aspecte structura triplexului este diferită de cea a duplexului. Acest model a rămas mult timp neschimbat, până la sfârșitul anilor 80, când studii spectroscopice și de RMN au arătat conformația furanozei ca fiind C2'-endo și nu C3'-endo.

10. STRUCTURI CUATERNARE DE ADN

Oligonucleotidele bogate în guanină se pot alinia și forma structuri quaternare neobișnuite, în care cele patru catene sunt ținute împreună prin împerecheri de baze Hoogsteen, între guanine. Acesta poartă denumirea de ADN-G și se poate forma:

- dintr-o singura catenă care se buclează de trei ori, sau
- dintr-un dimer cu două catene buclate sub forma unui ac de păr *(hairpin-looped strands)*, sau

- formând un cvadruplex din patru catene individuale de ADN.

Aceste regiuni bogate în guanină apar în zone ale cromozomilor conservate din punct de vedere evolutiv și funcțional, cum ar fi telomerele și regiunile promotoare ale genelor. Recent, au fost raportate formarea de structuri cuaternare asociate cu genomul HIV, precum și faptul ca un heptamer bogat în guanină se leagă de trombină.

Unele din aceste structuri au fost legate de oncogene cunoscute, precum și de procesele de declanșare a cancerului, încercându-se astfel determinarea unor zone ce gazduiesc situsuri active ce ar putea constitui noi ținte pentru medicamentele viitorului.

11. ASPECTE BIOFIZICE ȘI TOPOLOGICE PRIVITOARE LA STRUCTURA ADN

Adâncitura majoră din dublul helix are 12Å lățime, pe când adâncitura are 6Å lățime. Ele apar datorită faptului că punțile glicozidice ale unei perechi de baze nu sunt diametral opuse unele față de altele. Adâncitura minoră conține pirimidina O-2 și purina N-3 a perechii și este ceva mai adâncă (8,5Å) față de adâncitura minoră care are 7,5Å adâncime.

Fiecare adâncitură este delimitată de atomii potențiali donori și acceptori de hidrogen. În adâncitura minoră, N-3 al adeninei și guaninei ș O-2 al timinei și citozinei pot servi ca acceptori de hidrogen și grupul amino atașat la C-2 al guaninei poate fi un donor de hidrogen. În adâncitura majoră, N-7 al guaninei și adeninei este un potențial acceptor,după cum același rol îl are și O-4 al timinei și O-6 al guaninei. Grupul amino atașat la C-6 la adenină și C_4 al citozinei poate servi ca donori de hidrogen.

Dimensiunea mai mare a adânciturii majore o face pe aceasta mai accesibilă pentru interacțiuni cu proteine care recunosc secvențe specifice din ADN.

Endonucleaza de restricție EcoR V își găsește ținta prin scanarea adânciturii majore a ADN. Simetria moleculei endonucleazei se potrivește cu simetria țintelor sale. Această enzimă își caută ținta sa care este secvența GATATC, prin difuzia moleculei sale de-a lungul adânciturii majore: o buclă de suprafață din turul α al fiecărei subunități face contact cu adâncitura majoră; Când este întâlnită secvența specifică, apare un rearanjament structural major atât la nivelul enzimei, cât și la nivelul țintei ADN. În această potrivire indusă, ADN se înclină cu 50 de grade la centrul situsului hexanucleotidic de recunoaștere. Fiecare buclă de recunoaștere formează șase punți de hidrogen, toate în adâncitura majoră, cu două perechi exterioare de baze ale unei jumătăți de situs GAT Mg^{2+}, esențial pentru hidroliză, intră în situsul catalitic și devine coordonat numai atunci când este întâlnită secvența țintă.

În anul 1963, Jerome Vinograd a constatat că ADN circular din virusul *Polyoma* merge în două benzi, atunci când este centrifugat.

Analizând această ciudățenie, el a descoperit o propietate importantă a ADN circular, pe care nu o are și ADN linear.Considerând un duplex ADN de 260 pb, de formă B, așa cum se prezintă în figura 17 a, cum numărul de nucleotide pe tur de răsucire, într-o moleculă obișnuită de ADN este 10,4, această moleculă lineară de ADN are 25 / 260 /10,4 tururi de helicare. Dacă legăm capetele acestui helix putem produce un ADN circular relaxat (fig. 17 b). Dacă însă desfășurăam dublul helix cu două tururi, înainte de a reuni capetele se obține un ADN circular diferit (fig. 17 c).

Care sunt consecințele structurale ale desfășurării înainte de legare?

Sunt posibile două conformații limită: 1) ADN se pliază într-o structură ce conține 23 de tururi de helix B și o buclă desfăcută (fig. 17 d și 18) ADN adoptă o structură supersiralizată cu 25 de tururi de helix B și 2 tururi de superhelix dextral negativ (fig. 17 e).

Superspiralizarea modifică marcant forma generală a ADN. O moleculă superspiralizată de ADN este mai compactă decât o moleculă relaxată de ADN de aceeași lungime (fig. 17 e).

De aici, ADN superspiralizat se deplasează mai rapid decât ADN relaxat, în cursul centrifugării sau electroforezei. În experiența lui Vinograd, ADN care a sedimentat rapid a fost superspiralizat, pe când cel care a sedimentat mai încet a fost relaxat, deoarece una dintre catenele sale era crestată.

Topologia este o ramură a matematicii care se ocupă cu propietățile structurale ce rămân neschimbate în urma desfășurării precum întinderea și plierea. O propietate topologică cheie a unei molecule circulare de ADN este **linking number**, adică numărul de lincări sau legături (L_k) care este egal cu numărul de câte ori o catenă a ADN se înfășoară în direcția acelor de ceasornic (dextral) în jurul axei helixului, atunci când această axă este constrânsă să stea într-un singur plan.

Pentru ADN relaxat din figura 17 b, LK= 25. Pentru molecula desfășurată din fig. 17 d și cea superrăsucită din 17 e, LK=23, deoarece duplexul linear a fost desfăcut la nivelul a două tururi complete înainte de a fi închis. Moleculele care diferă doar prin valoarea LK sunt **izomeri topologici** adică topoizomeri, una pentru cealaltă. Topoizomerii ADN pot fi interconvertiți numai prin tăierea uneia sau ambelor catene și apoi resudarea acestora.

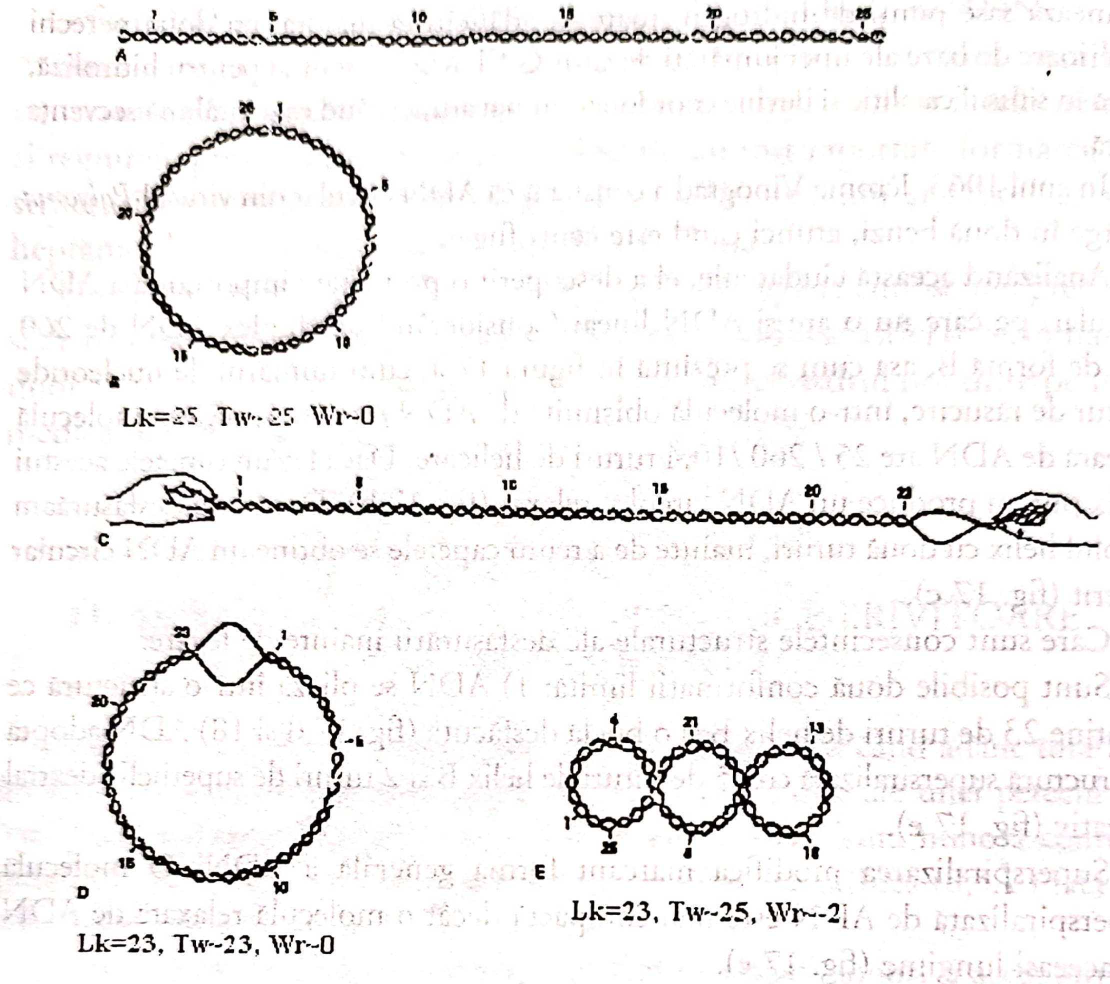

A
1
5
10
15
20
25
B
25
1
5
20
10
15
Lk=25 Tw~25 Wr~0
C
1
5
10
15
20
23
D
23
1
20
5
15
10
Lk=23, Tw~23, Wr~0
E
4
21
13
1
25
8
16
Lk=23, Tw~25, Wr~-2

Fig. 17 — Diagrama schematică în care se redă numărul de lincări (linking) (Lk), numărul de răsuciri (twisting) (Tw) și numărul de distrosiuni (writhing) (Wt) în moleculele circulare de ADN

a- sector liniar, întins de ADN; b- moleculă circulară relaxată; c- moleculă liniară de ADN desfăcută (unwound); d-cerc desfăcut; e- superhelicare negativă dextrală (după Saenger, 1984).

ADN desfăcut și ADN superrăsucit din 1D și 1E sunt topologoc identici, dar diferiți din punct de vedere geometric. Ei au aceeași valoare a L_k, dar diferă prin valoarea lui $\mathbf{T_w}$ (twist) și $\mathbf{W_r}$ (writhe). **Twistul** reflectă înfășurarea helicală a catenelor ADN, una în jurul celeilalte, pe când **writhe** este o măsură a spiralizării axei dublului helix (deformațiile riguroase ale lui $\mathbf{T_w}$ și $\mathbf{W_r}$ sunt complexe). Există a relație între L_k, T_w și W_r și anume, aceasta este: $L_k = T_w + W_r$.

În figura 17, ADN circular desfășurat are $T_w \sim 25$ și $W_r \sim -2$

Aceste forme sunt interconvertibile, fără clivarea catenei ADN deoarece ele au aceeași valoare L_k- 23. O scădere a valorii lui L_k determină atât superhelicare dextrală (negativă) a axei ADN, cât și o desfășurare a duplexului Watson-Crick.

Topoizomerii care diferă prin doar 1 în L_k și în consecință prin 0,7 în W_r, pot fi ușor separați prin electroforeză în gel de agaroză, deoarece valorile lor hidrodinamice sunt foarte diferite – superspiralizarea condensând macromolecula de ADN.

Cele mai multe molecule naturale de ADN sunt superspiralizate negativ.Gradul de superspiralizare a moleculei de ADN poate fi exprimat în termeni de densitate de superspiralizare (ó), care este independentă de lungime:

$$\sigma = (LK - L_{K0}) / L_{K0}$$

L_{KO} este numărul de lincare al unei molecule circulare relaxate de ADN. Pentru ADN superspiralat din figura 17 e, $L_K = 23$, $L_{K0} = 25$ și astfel $\sigma = -0{,}08$.

Densitatea de superspiralare a celor mai multe molecule naturale de ADN este de aproximativ –0,06. Semnul negativ înseamnă că suprahelixurile ADN în condiții normale, ca și în exemplul de mai sus sunt dextrale. Cu alte cuvinte, ele derivă din subspiralizare sau desfășurare. Superspiralizarea negativă prepară ADN pentru procese care implică separarea catenelor: *replicare, transcriere, recombinare.* Superspiralizarea pozitivă (fig. 18), ca de altfel și aceea negativă, compactează ADN, dar va face ca separarea catenelor să fie mult mai dificilă. Așa se explică de ce ADN nativ este superspiralizat negativ, în cele mai multe situații.

Interconversia topoizomerilor ADN este catalizată de enzimele **topoizomeraze,** descoperite de către James Wang și Martin Gellert. Aceste emzime modifică numărul de lincări ale ADN prin catalizarea unui proces desfășurat în trei etape :

1. clivarea uneia dintre cele două catene ale ADN ;
2. trecerea unui segment de ADN prin această ruptură ;
3. resudarea rupturii din ADN.

Topoizomerazele de tip I clivează doar o singură catenă de ADN, pe când topoizomerazele de tip II, clivează ambele catene ale duplexului ADN. Topoizomeraza I de *E.coli* catalizează relaxarea ADN superspiralizat negativ. Enzima acționează mai întâi ca nuclează și apoi ca ligază. Un capăt al catenei tăiate rămâne activat prin legarea sa covalentă la enzimă. Capătul 5'-fosfat al catenei se leagă la un hidroxil al tirozinei topoizomerazei care are 97kd. Capătul 3'-OH al catenei tăiate atacă nucleofil acest intermediar activat spre a restabili continuitatea covalent circulară. Singurul rol al acestei topoizomeraze este acela de a crea o tăietură tranzientă care permite trecerea prin ea a unui segment ADN.

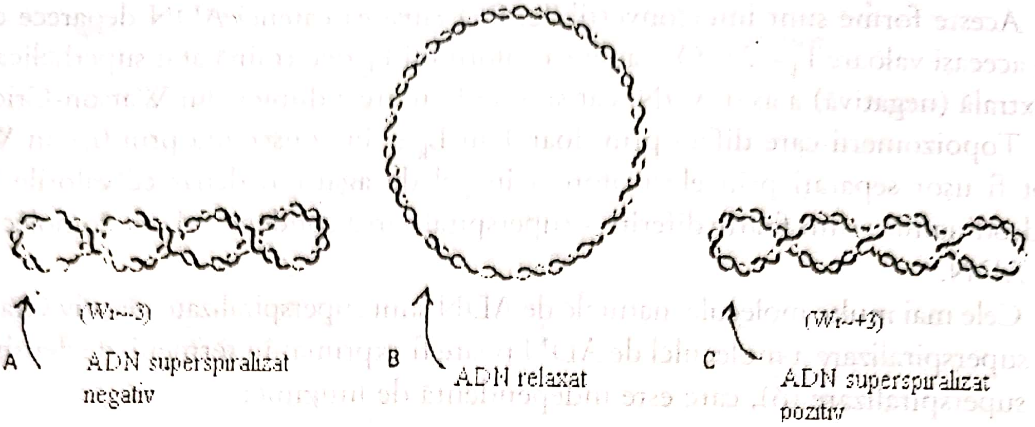


Fig. 18 — Diagrama moleculelor de ADN care prezintă superspiralizare diferită: A-superspiralizare negativă (Wr~-3); B-relaxat (Wr=0); C- superspiralizare pozitivă (Wr~+3, senestral) (din Streyer, 1995)

L_K al ADN superspiralizat negativ crește cu +1 (relaxare) cu fiecare ciclu catalitic (fig. 19). Topoizomeraza are o conformație structurală particulară, cu o gaură mare în centru, suficientă spre a adăposti un dublu helix ADN.

Reacția catalizată de topoizomeraza I-respectiv relaxarea ADN superspiralizat- este din punct de vedere termodinamic redusă. În ADN relaxat trebuie introduse superrăsuciri. Superrăsucirea este consumatoare de energie, deoarece o moleculă superspiralizată, în contrast cu una relaxată, este supusă unui stres torsionar. Introducerea unei superrăsuciri suplimentare într-o moleculă de ADN cu σ=-0,06 costă aproximativ 9kcal/mol. Astfel, în moleculele de ADN natural superspiralizate este depozitată o cantitate mare de energie.

Superspiralizarea ADN la *E.coli* este catalizată de ADN giraza- o topoizomerază care constă din două catene A, fiecare de 105 Kd și două catene B, având fiecate 95Kd.

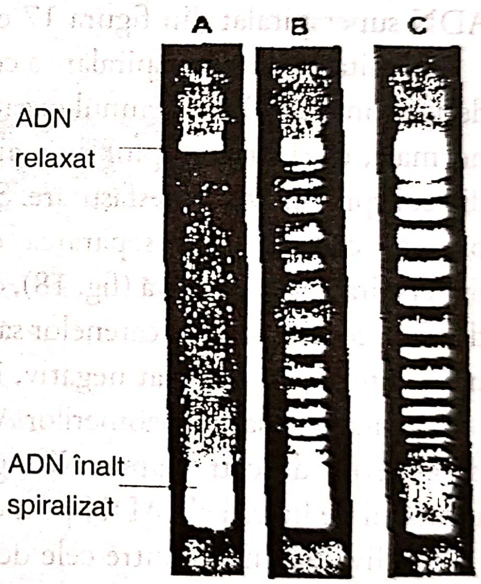


Fig. 19 — Modele de gel în care apare relaxarea ADN superspiralizat de SV40. A. ADN înalt superspiralizat negativ; B. Incubarea ADN cu o topoizamerază pentru 5 minute; C. Incubarea ADN cu o topoizomerază pentru 30 minute. În urma incubării cu topoizomeraza rezultă o serie de benzi care au superspiralizare redusă. Valorile Lk ale benzilor adiacente diferă prin 1 și valorile medii Wr prin ~ 0,7, (după Keller, din Streyer, 1995)

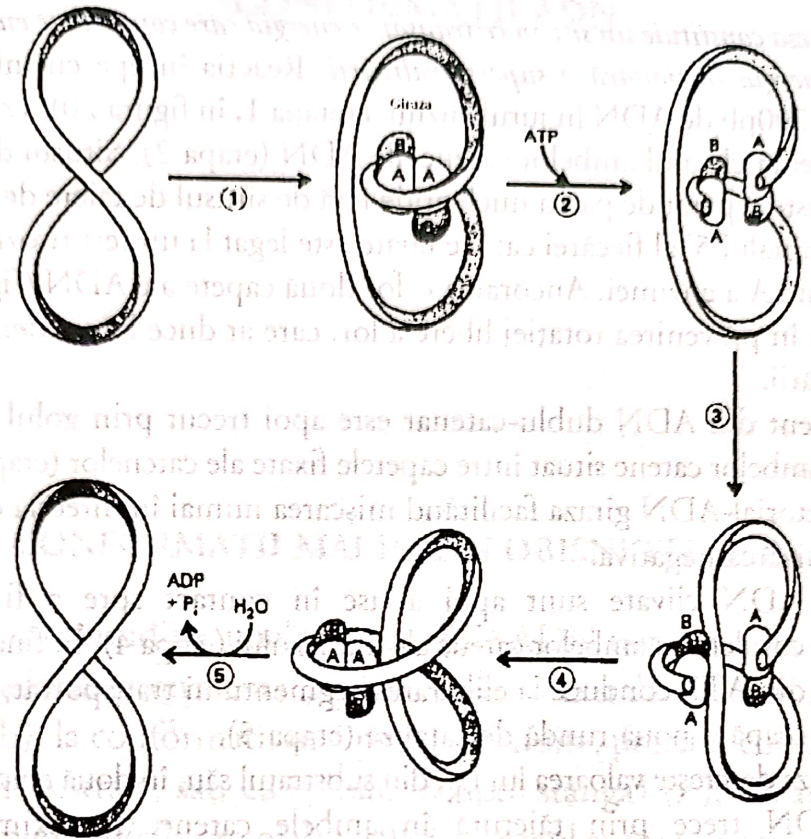


Fig. 20 — Acțiunea catalitică a ADN girazei în schimbarea valorii I_K a unei molecule bicatenare de ADN. Inițial ADN are o singură superspirală pozitivă. După tăierea ambelor catene, ele sînt reunite și ADN are a superspirală negativă. Valoarea I_K descrește cu 2 (după Cozzanelli, din Streyer, 1995)

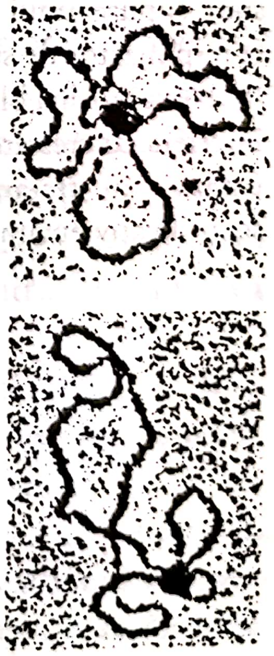


Fig. 21 — Imagine electronomicroscopică care arată ADN giraza legată la molecule de ADN superspiralizate negativ (din Streyer, 1995)

ADN giraza constituie un sistem ce transduce energia care convertește energia liberă a ATP în energia torsionară a superspiralizării. Reacția începe cu înfășurarea a aproximativ 200pb de ADN în jurul enzimei (etapa 1, în figura 20). Legarea ATP apoi declanșează clivajul ambelor catene ale ADN (etapa 2). Situsul de tăiere de pe o catenă este separat de patru nucleotide față de situsul de tăiere de pe cealaltă catenă. Terminalul 5' al fiecărei catene tăiate este legat la un rest tirozină specific dintr-o unitate A a enzimei. Ancorarea celor două capete ale ADN (fig. 21) tăiat este esențială în prevenirea rotației libere a lor, care ar duce la pierderea rapidă a superspiralizării.

Un segment din ADN dublu-catenar este apoi trecut prin golul rezultat în urma tăierii ambelor catene situat între capetele fixate ale catenelor (etapa 3). Acest pasaj este vectorial-ADN giraza facilitând mișcarea numai în direcția ce conduce la superspiralizarea negativă.

Capetele ADN clivate sunt apoi aduse în contact spre a fi restabilită continuitatea covalentă a ambelor catene ale duplexului (etapa 4). În final, hidroliza unei legături din ATP conduce la eliberarea segmentului transportat, permițând enzimei să înceapă o nouă rundă de cataliză (etapa 5).

ADN giraza descrește valoarea lui L_K, din substratul său, în două etape, deoarece duplexul ADN trece prin tăietură în ambele catene. Aproximativ două supespiralizări negative sunt introduse pe secundă. ADN giraza poate acționa repetat pe același substrat ADN, fără a se disocia de acesta.

Gradul de superspiralizare al ADN bacterian este astfel determinat de acțiunile contrarii ale celor două enzime. Superspiralizările negative sunt introduse de către **ADN girază** și sunt eliminate de către **topoizomeraza I.** Cantitățile acestor enzime sunt supuse unui control celular, astfel încât să poată fi menținut un grad corespunzător de superspiralizare negativă a ADN bacterian.

Novobiocina blochază legarea ATP la girază. Acidul nalidixic și ciprofloxacina interferă cu crestarea și reunirea catenelor ADN. Acești inhibitori ai girazei sunt utilizați în tratamentul bolilor infecțioase ale căilor urinare, neafectând semnificativ enzima specifică celulelor eucariote.

CAPITOLUL VII

CONFORMAȚII ADN

1. CONFORMAȚII MAI PUȚIN OBIȘNUITE ALE ADN

In anumite condiții, unele secvențe ale ADN pot schimba conformația ADN de la forma prevalentă *„right handed“* (dextrală sau cu spiralizare spre dreapta) (B), la conformații mai puțin obișnuite, precum conformația *„left handed“* (senestrală, sau cu spiralizare spre stânga) (Z), (Wang și colab., 1979); triplex (Wells și colab., 1988); tetraplex (Sen și colab., 1988) și cruciforme (Panayotatos, 1981).

1.1. ADN Z

Această conformație a fost descoperită în urma observației că spectrul de dicroism circular al nucleotidelor poly-d(CG), se schimbă la concentrații crescute de săruri, ceea ce a sugerat apariția unei noi forme conformaționale a ADN. Totuși, au fost necesare studii detaliate de cristalografie cu ajutorul razelor X, pentru a stabili existența structurii Z a ADN. Ulterior, s-au efectuat analize spectroscopice, chimice și enzimatice, pentru determinarea condițiilor necesare formarii in vitro a ADN –Z.

ADN-Z este o conformație mult mai energetică decât ADN-B, și se formează numai în cazul unor forțe torsionale puternice (de ex. în plasmidele puternic superîncolacite). ADN-Z apare în oligonucleotide scurte cu secvențe alternante purine-pirimidine (dar nu numai) și, în general, la concentrații mult mai mari de săruri (>3M) decât cea existentă in vivo. Alura în zig-zag a scheletului glucido fosforic, în care grupările fosfat sunt apropiate între ele, și situarea acestuia în interiorul moleculei sunt caracteristice acestei conformații. S-ar părea că ADN-Z apare în mod natural în porțiuni discrete ale ADN-B, sub influența unor proteine specifice care facilitează tranziția de la forma B la forma Z. Dacă în ADN-A și în ADN-B, toate bazele adoptă o orientare *anti*, în ADN-Z, pirimidinele sunt întotdeauna orientate *anti*, iar purinele sunt întotdeauna orientate *syn* (conformațiile *anti* și *syn* ale ADN permit, respectiv împiedică, rotația liberă a bazelor în raport cu legătura N-glicozidică. Se considera deci orientarea bazei heterociclice în raport cu inelul glucidic legat prin legătura glicozil, In conformația *sin*, inelul de șase elemente al bazei purinice, sau atomul

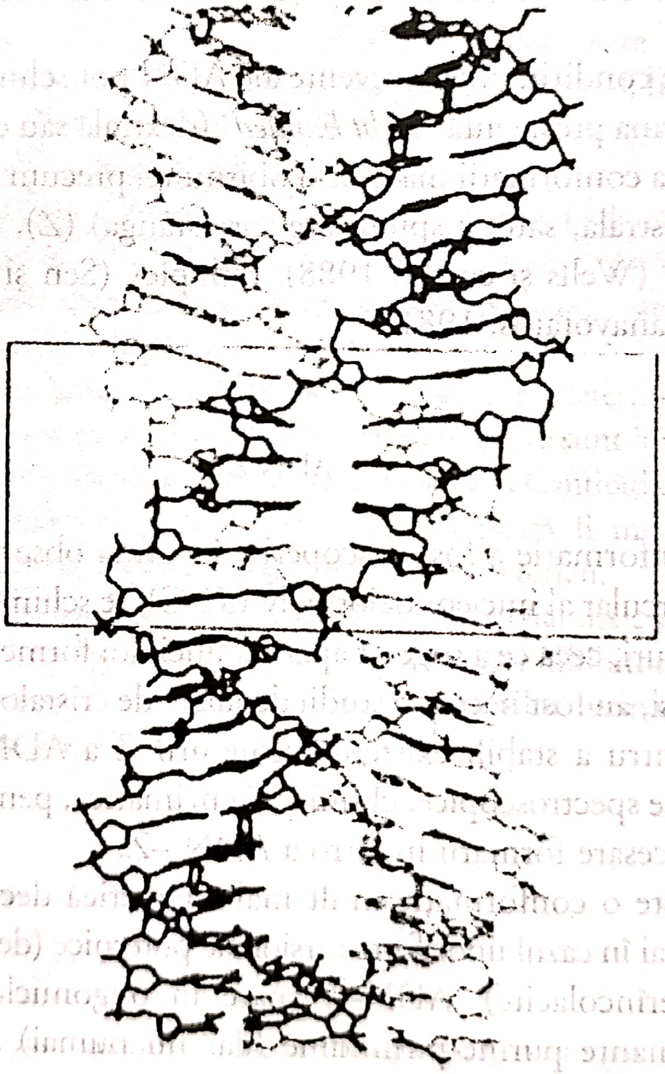


Fig. 1 — ADN-Z intercalat în secvența de ADN-B.

de oxigen al bazei pirimidinice este îndreptat spre partea superioară a inelului furanozic). ADN-Z conține 12 baze per spiră de helix, adâncitura (fosa) mare este întinsă, iar cea mică este îngustă și adâncă.

S-a constatat că și alte secvențe de baze, diferite de alternările pur-pyr pot forma ADN-Z. Ușurința cu care secvețele formează ADN-Z depinde de bazele azotate ale nucleotidelor din care sunt alcătuite acestea. Astfel, următoarele secvențe sunt plasate în ordinea descrescătoare a ușurinței cu care formează ADN-Z: (CG)n, d(TG)n, d(GGGC)n, d(TA)n.

In vitro, au fost studiate mai multe polinucleotide care au conformație Z. Astfel, secvența d(CGCGCG) a fost cristalizată în forma Z, în trei condiții diferite: în mediu care conține numai Mg, în mediu cu spermină și Mg și în mediu numai cu spermină.

Aceasta conformație este stabilizată la temperaturi scăzute, care reduc mișcările moleculare.

Jhonston și colab. (1992) și Palecek și colab. (1991), au stabilit că secvențele d(CG)$_{4\text{-}7}$ prezintă un echilibru dinamic între formele B și Z, în timp ce, în cazul nucleotidelor mai lungi, predomină conformația Z. De asemenea, pentru această conformație, este necesară starea superspiralizată a ADN (Jong-Myoung Kim și colab., 1996). De asemenea, s-a demonstrat că metilarea citozinei la carbonul 5 produce stabilizarea formei Z a ADN.

1.2. CONFORMAȚIA ADN-Z IN VIVO.

Această conformație poate apare in vivo, fie ca structură independentă, fie ca structură interacalată, pe anumite porțiuni ale ADN cu conformație B.

Formarea joncțiunilor B-Z întâmpină o barieră energetică importantă, fiecare din cele două conformații având o energie liberă $\Delta G \sim +4$Kcal/mol. Analiza a 137 gene umane complet secvențiate a demonstrat că secvențele ce pot forma ușor ADN-Z au fost prezente la 98 dintre acestea. Distribuirea acestor secvențe în gene este nerandomică, ele fiind de 10 ori mai frecvente în regiunile 5', decât în regiunile 3', ale genei.

Peck și colab. (1982) au stabilit că, în condiții fiziologice, tranziția la *structura „left handed"* are rolul să elimine tensiunea torsională existentă în ADN *„right-handed"*.

Secvențe alternative polipurin–polipirimidinice, care pot adopta conformația Z, au fost găsite în multe microorganisme pro și eucariote precum și în diferite celule vegetale și animale (Wang și colab., 1979; Paleek și colab., Bianchi și colab., 1990; Kilpatrick și colab., 1984; Ferl și colab., 1992; Vlach și colab., 1989; Thomas și colab., 1990).

Conformația Z este importantă datorită multiplelor sale roluri posibile în procesele genetic–moleculare printre care enumerăm:

-rolul ADN-Z în transcripție, dedus din marea frecvență a acestei conformații în regiunile transcripțional active, din cromozomi, la *Drosophila;*

-rolul reglator al expresiei genice, sugerat atât de prezența acestei forme conformaționale, în regiunile aproapiate de capetele 5' ale genelor, cât și de faptul că în aceste regiuni are loc o schimbare a activității polimerazelor, implicate în transcripție;

-rolul în procesul recombinării genice (Freund și colab., 1989) este sugerat de existența unei mari frecvențe a recombinărilor în regiunile bogate în ADN-Z .

In regiunile „recombiționale fierbinți“ din genomul eucariotelor se găsesc secvențe $d(GT)_n$, capabile de a adopta conformația ADN-Z. Un alt argument, în același sens, este faptul că proteinele recombinaționale (RecA, de exemplu) se leagă de preferință de ADN–Z.

Formarea ADN-Z ar putea facilita recombinarea domeniilor cromozomale omoloage, prin deformarea topologică care apare în urma răsucirii duplexurilor intacte. Secvența d(CA/GT)n formatoare de ADN-Z favorizează recombinările.

Au mai fost sugerate și alte funcții ale ADN-Z și anume: rolul în formarea și localizarea nucleozomilor; rol în organizarea domeniilor cromozomale (Garner și colab., 1987), rolul de situs de recunoaștere pentru topoizomeraza II (Arndt și colab., 1993), cât și pentru alte proteine (Herbert și colab., 1993; Herbert și colab., 1995). Datorită identificării proteinelor care se leagă de ADN-Z, s-ar putea detecta indirect prezența ADN-Z in vivo și s-ar putea stabili rolul său biologic în plasmide. Natura dinamică a proceselor genetice și natura tranzitorie a conformației ADN-Z, îngreunează stabilirea rolurilor celulare exacte ale acestei conformații.

La *E. coli*, ADN-Z poate apărea în plasmidele care suferă torsionări superhelicale extreme, în absența altor factori externi. Alte studii au evidențiat că la *E. coli*, ARN polimeraza nu transcrie ADN-Z, iar formarea ADN-Z în urma polimerazei în mișcare poate bloca activitatea următoarei molecule de ARN polimerază. Aceasta poate asigura separarea spațială dintre polimerazele succesive atașate la matrița ADN.

Într-un studiu al ADN din *Halobacterium halobium*, Jong-Myong și colaboratorii (1996), au demonstrat că în genomul acestei arhebacterii există multe secvențe care pot adopta conformația ADN-Z, atunci când sunt clonate în plasmidele de *E. coli*. Aceste secvențe sunt, în general, repetiții scurte, alternative, de purine și pirimidine, bogate în nucleotide cu G și cu C, iar supraîncolacirea accentuată și concentrația mare de săruri din mediu, constitue condiții favorizante pentru stabilizarea unei conformații „*left handed*“, și în cazul bacteriei studiate. Aceste descoperiri indică faptul că o mare varietate de organisme procariote, în special cele cu genomuri bogate în GC, ar putea conține ADN cu conformația Z

La eucariote, demonstrarea existenței ADN-Z s-a făcut indirect, utilizând proprietatea intens imunogenă a acestei conformații. Spre deosebire de ADN-B, ADN-Z este foarte imunogenic. S-au obținut anticorpi mono sau policlonali ce recunosc această conformație.

La protozoarele ciliate, anticorpii au fost utilizați pentru amprentarea micro și macronucleului. La ciliate, micronucleul este utilizat pentru reproducere, iar macronucleul este sediul tuturor proceselor metabolice legate de transcripție. Marcarea apare exclusiv în macronucleu, nu și în micronucleu

La *Drosophila*, s-au utilizat anticorpi anti ADN-Z de iepure și de oaie pentru marcarea cromozomilor politeni. S-a obținut un model neobișnuit de marcare între benzi, dar nu și în benzi.

La mamifere, nu s-a constatat nici un fenotip corelat în mod cert cu prezența secvențelor formatoare de ADN-Z. In tumorile umane s-a constatat că secvențe cu potențial de formare a ADN-Z se găsesc în regiunea rupturilor cromozomale punctiforme, fără a se reuși și stabilirea unor relații cauzale. Analizele pacienților cu boli autoimune (în special *lupus eritematos*) au furnizat primul indiciu al existenței ADN-Z. Acești pacienți, mai ales în timpul exacerbării bolii, produc anticorpi înalt specifici, față de ADN-Z.

1.3. ADN E

Vargason (2000) a demonstrat că secvența d(GGCGCC) formează cristale de ADN-B standard, iar secvențele d($GGCGm^5CC$)$_2$ și d($GGCGBr^5CC$)$_2$ formează o conformație nouă, denumită de către autori, conformația E (fig. 2) și care are caracteristicile structurale atât ale ADN-A cât și ale ADN-B. Acestă conformație E face tranziția dintre conformațiile B și A ale ADN. Este o conformație extinsă și excentrică, formată prin metilarea sau bromurarea secvenței (GGCGCC)$_2$.

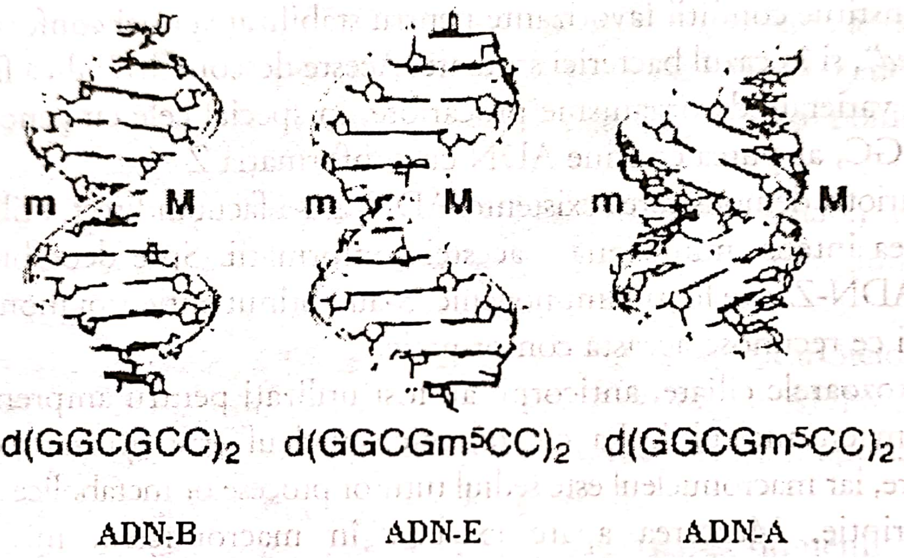


Fig. 2 — Reprezentarea structurii ADN-E comparativ cu structurile ADN-B și ADN-A

Ca și ADN-B, ADN-E are un ax lung helicoidal, iar bazele sunt așezate perpendicular pe acest ax. Totuși, caracteristicile foselor sunt aceleași cu cele ale ADN-A, și anume: o fosă mare adâncă și o fosă mică, îngustă. Aceste caracteristici sunt determinate de poziția C3' a moleculei de deoxiriboză. Dacă o soluție de ADN este lăsată să cristalizeze un timp mai lung decât cel necesar formării ADN-E, are loc formarea ADN-A. Interpretarea dată acestor fapte de către autori este că ADN-E ar fi o formă cinetic blocată, în cursul tranziției de la forma B la forma A.

ADN-E și ADN-B cristalizează în condiții foarte asemănătoare, spre deosebire de ADN-A, care necesită deshidratare pentru a cristaliza. Secvența d(GGCGm^5)$_2$, prin cristlizare, generează, după două săptămâni, ADN- E, dar după două sau trei luni, formează dublu helix A standard. Autorii presupun că ADN-E ar putea juca rol în timpul mutației care produce tranziția dm^{5}C la perechi de baze dT-dA.

2. MODIFICĂRI CONFORMAȚIONALE PRODUSE ÎN URMA METILĂRII SAU BROMURĂRII CITOZINEI

Nucleozidul 5 metil deoxicitidina (dm^{5}C) este deoseori considerat al 5–lea nucleozid. El permite distingerea perechilor de baze parentale de cele ale ADN nou format cât și ADN al gazdei de cel al virusurilor. La eucariote, dm^5 C este implicat în *imprinting*-ul genetic, în inactivarea cromozomului X și în inactivarea genelor. Efectul metilării citozinei asupra ADN dublu helicoidal prezintă deci un mare interes. S-a arătat că metilarea și bromurarea citozinei stabilizează ADN-A și ADN-Z. Totuși, nici pentru formarea ADN-A și nici pentru formarea ADN-Z, metilarea nu este indispensabilă, ea favorizând doar aceste conformații.

Conformatiile ADN descrise mai sus se referă la molecule bicatenare. In afară de acestea mai există și molecule monocatenare sau multicatenare de ADN

3. INCIDENȚA NATURALĂ A ADN MONOCATENAR

Nu toate formele naturale ADN sunt dubluhelicale. Toate formele de ADN circulare monocatenare sunt relativ mici: de exemplu, bacteriofagii *φX174* și *M13* conțin aproximativ 5386 și respectiv 6000 nucleotide și sunt între 1,5–2 nm în lungime. Cele ale parvovirusurilor și virusurilor plantelor sunt, de asemenea monocatenare și de aproximativ de 2/3 până la 1/2 mai mici, decât cele de mai sus. Totuși, replicarea fiecăruia din aceste tipuri de ADN viral implică conversia unei monocatene circulare în structură circulară dublu catenară. Tot astfel, expresia informației genetice în asemenea genomuri are loc întotdeauna pe calea formei bicatenare care este substrat pentru transcrierea secvențelor ADN în ARN.

4. ADN TRIPLEX

Frank Kamenetski și Mirkin S.M (1995) au prezentat un amplu studiu de sinteză asupra acestei conformații speciale a ADN.

ADN triplex este caracterizat prin prezența unor baze purinice sau pirimidinice în fosa mare a ADN și care formează punți de hidrogen „Hoogsteen" cu purinele din perechile de baze Watson-Crick.

Triplexuri intermoleculare se pot forma, experimental, între oligonucleotidele formatoare de triplexuri (*TFO-triplex forming oligonucleotides*) și moleculele țintă din duplexul de ADN. TFO sunt potențiale droguri genice care ar putea fi folosite într-o strategie anti-genă, menită să moduleze activitatea genică in vivo. Triplexurile ar putea sta la baza formării unor complexe cu o înaltă specificitate de secvență care ar fi eficiente în represia transcrierii genelor, dorită în anumite cazuri patologice.

Se cunosc numeroase structuri analoage ale TFO, printre care și acizii nucleici peptidici (PNA). In structura acestora, scheletul glucid-fosfat este înlocuit cu un schelet peptidic. PNA formează bucle în timpul interacției cu ADN duplex. Triplexul format este alcătuit din bucla PNA și unul din lanțurile duplexului, în timp ce celălalt lanț al acestuia este deplasat.

Triplexurile intramoleculare intră și în constituția **ADN-H**; acestea sunt structuri neobișnuite, formate în regiunile superspiralizate ale ADN. Acestea se pare că ar fi implicate în recombinarea genică (Weinreb și colab., 1990; Kim și colab., 1994; Rooney și colab., 1995), în reglarea genelor, (Kato și colab., a și b, 1992; Firulli și colab., 1994; Bacolla și colab., 1995), în mutageneză (Jaworski și colab., 1989) și în terminarea replicării ADN (Lapidot și colab., 1989; Baran și colab., 1991; Dayn și colab., 1992; Samadashwily, 1993)

5. MODELE DE ASOCIERE A CATENELOR DE ADN ÎN TRIPLEXURI

Frank Kamenetski și colab. (1995) de la Institutul de Genetică Moleculară din Moscova, au elaborat unele modele de triplexuri: pirimidină-purină-pirimidină sau pirimidină purină-purină. În aceste triplexuri, un lanț purinic aparține ADN dublu helix, în a cărui fosă mare se află baze purinice sau pirimidinice. Mai pot exista și triplexuri formate prin plierea unui singur lanț (triplexuri intramoleculare). De asemenea, alți autori au mai arătat că se pot forma triplexuri din lanțuri ADN și ARN, precum și din combinațiile lor.

Analiza prin difracția în raze X susține ipoteza existenței triplexului poliU-poliA-poliU, sau poliT-poliA-poliT. Modelele de triplex se bazează și pe identificarea în genomurile eucariotelor a unor secvențe (dT dC)n (dA.dC)n care prezintă o mare sensibilitate la DN-aza I și nucleaze cu specificitate de monocatenă. Prin metoda rezonanței magnetice nucleare, s-a reușit evidențierea formării unui astfel de triplex între catene homopurinice (A-G) și catene homopirimidinice (T-C). In condiții specifice, se formează un triplex (T-C).(A-G).(T-C*). Intre primele două catene, una homopurinică și cealaltă homopirimidinică se formează legături de tip Watson-Crick, pe când cea de a doua catenă homopirimidinică (T-C*), se împerechează cu catena homopurinică prin legături *Hoogsteen*. Triplexul se formează preferențial în condiții de pH scăzut (< 5) și exces de catene T-C.

6. ADN CU PATRU SAU CINCI CATENE

In 1989, Sundquist și Klung au demonstrat că moleculele artificiale de ADN care au un capăt neted și la capătul opus o coadă monocatenară TTGGGGTTGGGG formează în soluție dimeri foarte stabili. Asemenea cozi monocatenare ar putea exista și în condiții native la moleculele de ADN lineare, din cromozomii eucariotici.

Prin îndoire, capetele monocatenare formează structuri *hairpin* stabilizate de perechile G:G, legate prin legături Hoogsteen. Prin asocierea a două câte două structuri *hairpin* rezultă tetrade 4G care pot constitui elemente de *linkage* (înlănțuire) molecular. Acest proces este avantajat de faptul că polinucleotidele bogate în G pot forma agregate inter și intra moleculare.

Modelul Sundquist-Klung este un model de recunoaștere-asociere a două secvențe ADN care sunt mai curând identice decât complementare. Asemenea recunoașteri-asocieri ar putea explica împerecherea intimă a cromozomilor omologi în meioză, purtători de molecule omoloage sau identice de ADN, procesul putând fi inițiat de intervenția unor proteine de cuplare. In acest model, spre deosebire de cel elaborat de către Sen-Gilbert (1988) toate catenele adiacente sunt antiparalele, putându-se forma și quadruplexuri intramoleculare.

Klung a prezentat structura unui quartet -G antiparalel cu secvența d(GGGGTTTTGGGG), iar după doi ani, Laughlan a prezentat structura tetraplexului paralel de G, format de d(TGGGGT) (fig. 3).

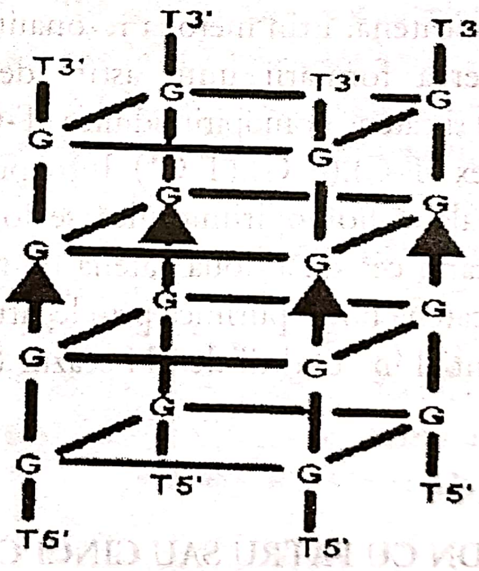


Fig. 3 — Tetraplex format din secvențe d(TGGGGT) paralele.

Deși împerecherea este identică în aceste structuri, în structura antiparalelă, relația conformațională dintre baze și zaharuri alternează între *syn* și *anti* , în timp ce în structurile paralele ea este constant *anti*. Aceste structuri se formează în timpul dimerizării genomului HIV (ca tetraplexuri ARN) și în timpul evenimentelor de recombinare a genelor imunoglobulinelor.

Rich (1994) a prezentat o structură tetracatenară formată din d(CCCT). In această structură, două catene sunt paralel împerecheate, formând perechi de baze citozină-citozină protonată (C-C+). In structura cristalină a d(CCCT), două duplexuri antiparalele se intercalează cu perechile de baze C-C+, pentru a forma o structură tetracatenară. Structura prezintă și o răsucire de aproximativ 17–. La capătul ambelor duplexuri, T se împerechează cu T terminală a structurii similare din tetramer. Altă T adoptă o conformație paralelă cu axul helixului și se sprijină pe T simetrică pentru a întării cristalul. Deși protonarea unei jumătăți din citozine este necesară pentru realizarea împerecherii, cristalele pot crește la pH neutru.

7. STIVUIREA G-G, CU CATENE ÎNCRUCIȘATE

Această structură a fost găsită în repetițiile în tandem (TGGAA) de la nivelul centromerilor cromozomilor umani.

Structurile purinice cu catene încrucișate de tip G-G și A-A se formează din perechi adiționale G-A ale secvenței 5'- GA/GA-3'. Există și alte situsuri în care apar împerecheri purină –purină, de tip A-G, precum și împerecheri G-A, formate prin apropierea unei perechi A-C adiacentă unei perechi G-A din secvența 5'-AA/GC-3'. Această secvență cu „buclă internă", este conservată în două familii de inhibitori ai reverstranscriptazei virusului HIV, formați din ADN monocatenar .

8. ADN-PLIAT (BEND DNA)

Plierea ADN are loc sub influența tracturilor A. Există trei modele pentru mecanismul de pliere la tracturile A. In primul, plierea apare chiar în tractul A; în al doilea, are loc la nivelul joncțiunii și este produsă prin tranziția structurală de la tractul A la secvența generală ADN; în al treilea -plierea are loc în secvența generală ADN.

9. STRUCTURI CRUCIFORME ÎN ADN DE LA E. COLI

Aceste structuri au fost demonstrate, utilizând ca probă o genă a endonucleazei clonate din fagul T_7. Enzima clivează, in vitro, preferențial, regiunile monocatenare cruciforme, din plasmidele superrăsucite. Inducerea endonucleazei (codificată de o plasmidă — pLAT 75, care conține și Col E I) inversează secvența repetitivă rezultată din degradarea genomului ADN și din crestarea intracelulară și linearizarea plasmidei. In vivo, situsul de clivaj a fost localizat la secvența inversată de ColE I și coincide cu situsul clivat specific in vitro, de către nucleazele T7 și SI, doar când aceste repetiții inversate au o structură cruciformă. Astfel, se sugerează că structurile cruciforme există intracelular și se demonstrează utilitatea endonucleazelor pentru studiul topologiei ADN, in vivo. S-a propus utilizarea acestor enzime, cu specificități diferite de legare și clivare, pentru identificarea regiunilor monocatenare cruciforme.

O singură crestătură în ADN circular, superîncolăcit, elimină superîncolacirea și relaxează structura circulară, deoarece molecula nu mai este topologic constrânsă. Orice modificare fizică sau chimică, care reduce numărul de ture de helix per moleculă, va micșora sau elimina superîncolacirea negativă.

10. SUPRASTRUCTURI

Date cristalografice, obținute prin analiza fragmentelor tripluhelicale scurte, arată că acestea sunt generate prin interacțiunile moleculelor învecinate din cristale. Două asemenea structuri, implicând triplexurile GGC paralele (*Hoogsteen*) și antiparalele (*Hoogsteen reverse*), au fost prezentate anterior.

Structura d(CCGCGG), cu conformația de ADN-Z, nu formează un duplex normal. In această structură, restul dC terminal al fiecărei catene oscilează departe de helix, pentru a forma perechi de baze Watson-Crick, cu resturile dG terminale ale duplexului simetric înrudit, formând duplexuri gemene. Aceasta este prima observație, conform căreia un nucleotid invadează alt duplex, în loc să se cupleze cu partenerul Watson -Crick disponibil, din propriul duplex. Prezența unei perechi de baze terminale neconvenționale distorsionează considerabil centrul tetramerului central de la ADN-Z tipic. Parametrii helicali și stivuirea perechilor de baze terminale sunt reminiscențe ale ADN-B, mai degrabă decât ale ADN-Z.

11. ADN DIN NUCLEOPROTEINE

ADN din interiorul celulelor este în mod normal asociat cu proteine. Proteina legată desfășoară ușor helixul. In consecință, numărul helixurilor per unitate de lungime este mai mic decât în ADN-B. Când proteina este îndepărtată, numărul de răsuciri orientate spre dreapta este restabilit. In cazul ADN linear, aceasta are loc rapid din cauză că cele două lanțuri sunt libere să se rotească unul în jurul celuilalt.

In ADN circular închis însă, numărul de înfășurări este topologic fixat, ceea ce înseamnă că numărul de înfășurări ale unei catene în jurul celeilalte nu poate fi schimbat, fără răsuciri compensatorii, în altă poziție. Deci, când duplexul natural circular este eliberat de proteinele cu care el este adesea asociat in vivo, se petrec două lucruri distincte:

1. numărul de înfășurări helicale de dreapta ("*right handed*") este crescut până la valoarea caracteristică ADN-B;
2. duplexul însuși este răsucit de un număr egal de ori, în sens opus (negativ) pentru a compensa creșterea numărului de răsuciri helicoidale. Asemenea molecule se spune că sunt negativ superîncolacite.

O singură crestătură în ADN circular superîncolacit elimină prin acțiunea topoizomerazelor superîncolăcirea și relaxează structura circulară, deoarece molecula nu mai este topologic constrânsă. Orice modificare fizică sau chimică, care reduce numărul de ture de helix per moleculă, va micșora sau elimina superîncolacirea negativă.

12. PUNȚILE DE HIDROGEN DINTRE BAZELE AZOTATE

Pentru toate formele ADN, legăturile de hidrogen sunt foarte importante. Aceste legături sau punți de hidrogen sunt rezultatul interacțiilor dintre atomii de O și de N ai bazelor azotate din nucleotidele duplexului ADN.

Legătura dintre adenină și timină se face prin intermediul a două punți de hidrogen, una stabilită între atomul de hidrogen din gruparea NH_2 extrainelară, de la C_6 al adeninei, și oxigenul din gruparea CO, din poziția 6 a timinei, iar a doua, între hidrogenul din gruparea intrainelară NH din poziția 1 a timinei și azotul din poziția 1 a adeninei. Se formează astfel perechea de baze azotate A T sau T A.

Legătura dintre guanină și citozină, formează perechile G C și C G prin intermediul a trei punți de hidrogen. Acestea se formează între hidrogenul din gruparea $NH_{2,}$ de la C_6 al citozinei și atomul de oxigen din gruparea ceto, din poziția 6 a guaninei, între N din poziția 1 a citozinei și hidrogenul din gruparea NH din poziția 1 a guaninei, și, în sfârșit, între oxigenul din gruparea CO a poziției 2, din citozină și hidrogenul din gruparea NH_2, de la C_2 al guaninei.

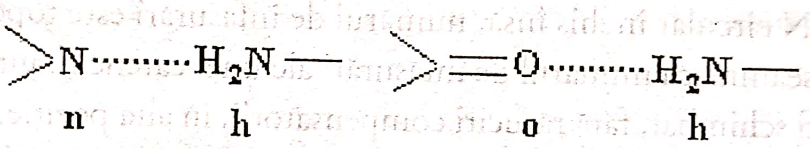


Fig. 4 — Reprezentarea schematică a punților de hidrogen; n = azotul (acceptor al legăturii de hidrogen); o = oxigenu (acceptor al legăturii de hidrogen); h = donorul amino al legăturii de hidrogen.

13. ENZIME IMPLICATE ÎN SCHIMBAREA CONFORMAȚIEI ADN

Endonucleazele de restricție au origine bacteriană și prezintă următoarele proprietăți: produc linearizarea ADN circular, recunosc și îndepărtează ADN nemetilat, recunosc situsuri palindromice cu bisimetrie rotatorie, au o mare specificitate, recunoscând fosa mare din duplexul ADN. Din cauza capacității lor de a fragmenta ADN, enzimele de restricție reprezintă instrumente importante, utilizate în Genetica moleculară, în tehnologia ADN recombinant și în investigații genomice la nivel molecular.

Ligazale au următoarele proprietăți: unesc fragmentele de ADN, consumă energie furnizată de NAD, în cazul procariotelor, și ATP, în cazul eucariotelor, formeză o legătură fosfodiesterică între 3'-OH și 5'-fosfat, sunt necesare pentru replicarea și repararea ADN, acționează numai pe ADN dublu catenar, formează legături fosfoamidice în care intervine centrul lor activ care conține glicina, sunt utilizate în biologia moleculară pentru crearea unor molecule de ADN, cu proprietăți speciale.

Topoizomerazele sunt enzime ubicvitare, prezente atât în toate celulele procariote și eucariote, cât și în unele virusuri. Ele controlează gradul de supraîncolacire al ADN și sunt necesare pentru a desface nodurile și încolăcirile din materialul genetic, inevitabile în nucleii eucariotelor în care se găsesc câțiva metri de ADN, răsucit și pliat într-un spațiu cu diametrul de doar câțiva microni și care se rotește cu o viteză mare în timpul replicării, în cursul căreia se pot forma structuri neobișnuite și anume supraîncolăciri și structuri concatenare. Supraîncolăcirile sunt de două tipuri: pozitive și negative. In timpul supraîncolăcirilor negative ale unei molecule de ADN, segmentul anterior al ADN dublu catenar traversează (încrucișează) în mod repetat segmentul său posterior, de la stânga spre dreapta. In timpul supraîncolăcirilor pozitive, are loc același proces, dar în sens invers, de la dreapta la stânga.

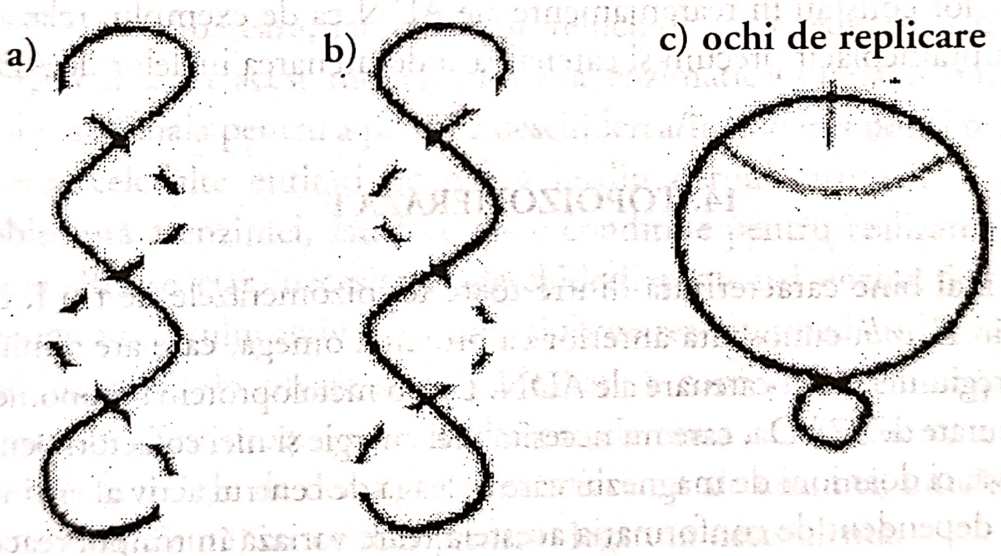


Fig. 5 — Tipuri de structuri ADN superîncolăcit: a) structura supraîncolăcită negativ. Segmentul anterior al ADN încrucișează segmentul posterior de la stânga spre dreapta; b) structura supraîncolăcită pozitiv; c) structura pozitiv supraîncolăcită de ADN bacterian, în timpul replicării.

Supraîncolăcirile ADN sunt înlăturate de către topoizomeraze, prin cataliza scindării tranzitorii și a reunirii catenelor ADN. Există două tipuri de topoizomeraze: de tipul I, care îndepărtează doar supraîncolăcirile negative și care taie numai unul dintre lanțurile dublului helix, permițând trecerea unui segment de ADN monocatenar prin breșa formată, și topoizomerazele de tipul II, care taie în același timp ambele catene, permițând trecerea prin breșa formată a unui alt segment duplex de ADN. In cazul topoizomerazei II, numărul de legături chimice este schimbat într-o singură etapă, iar în cazul topoizomerazei I, în două etape,.

Toate topoizomerazele funcționează prin formarea unor legături fosfotirozinice tranzitorii, între enzimele care conțin tirozina în centrul lor activ, și scheletul fosfodiesteric al ADN, care permite trecerea ADN mono sau bicatenar prin breșa din scheletul fosfodiesteric. In acest proces, este folosită energia furnizată de legătura fosfodiesterică, și deci nu este necesară nici o sursă externă de energie.

Rolul major al topoizomerazelor este de a asigura „descurcarea“ ADN în timpul replicării. In afară de rolul lor în replicarea ADN, aceste enzime mai sunt implicate în transcripție și în recombinarea genetică. Concret, funcțiile lor constau în rearanjamente ale ADN ca de exemplu, relaxarea ADN supraîncolăcit precum și catenarea și decatenarea inelelor de ADN.

14. TOPOIZOMERAZA I

Cea mai bine caracterizată dintre toate topoizomerazele de tip I, este aceea din *E. coli*, cunoscută anterior ca proteina omega, care are afinitate pentru regiunile monocatenare ale ADN. Este o metaloproteină monomeră, cu o greutate de 97 kDa, care nu necesită nici energie și nici cofactori pentru a fi activă, ci doar ioni de magneziu care se leagă de centrul activ al enzimei, în mod dependent de conformația acesteia (care variază în timpul reacției enzimatice). In structura sa se găsec trei ioni Zn^{2+}, localizați în porțiunea carboxiterminală, de 30 kDa, unde se găsește și motivul de 4 molecule de cisteină. Indepărtarea zincului, anulează capacitatea de relaxare, menținându-se capacitatea enzimei de a scinda ADN monocatenar.

Structura cristalină a capătului amino terminal are 67kDa, conține 4 domenii pliate, aflate în contact, care generează o structură terțiară toroidală asimetrică. Domeniul III conține tirozina (Tyr 319), care este centrul catalitic pentru clivarea oligonucleotidelor monocatenare. Tot în acest domeniu se găsesc și multe resturi de aminoacizi înalt conservate în filogenie. Restul domeniului, de 67kDa, este constituit dintr-o structură secundară alfa helicală.

15. MECANISMUL DE ACȚIUNE AL TOPOIZOMERAZEI I

Mecanismul de acțiune al reacțiilor de *catenare/decatenare* ale ADN dublu catenar, presupune existența a două conformații ale proteinei respective: una închisă și una deschisă. Topoizomeraza I din *E. coli* poate catena și decatena două entități de ADN circular dublu catenar, cu condiția ca unul din ele să aibă o crestătură sau un *gap* în unul din lanțuri, cu alte cuvinte o porțiune monocatenară, enzima putând cliva doar ADN monocatenar. Consecutiv, se formează un complex covalent de proteină enzimatică-ADN. Complexul poate forma o „poartă“ (deschidere), prin care trece un alt fragment de ADN monocatenar. In procesul de decatenare, acest fragment de ADN se eliberează, iar poarta se reînchide prin religarea scheletului fosfoglucidic. In acest model, proteina enzimatică suferă o modificare conformațională pentru a permite deschiderea/închiderea porții precum și trecerea celeilalte entități de ADN în/din corpul enzimei. Topologia neobișnuită a enzimei, satisface toate condițiile pentru realizarea acestui proces. Reiese clar, necesitatea deschiderii proteinei enzimatice pentru expunerea centrului activ – tirozina, și formarea intermediarului fosfotirozinic. Reacțiile de clivare și de schimbare a conformației sunt probabil cuplate. In acest proces, este posibil ca cele două capete libere, temporar formate, să se lege de două domenii adiacente ale enzimei; unul printr-o legătură covalentă, iar celălalt printr-o legătură necovalentă.

16. TOPOIZOMERAZA II

Topoizomeraza II este o proteină nucleară majoră, prezentă într-un număr mare de copii. Este asociată cu scheletul nuclear și poate recunoaște motive ADN de 30–90 kb. Există 2 izoenzime (alfa și beta) ale acestei enzime, codificate de gene situate pe cromozomi diferiți. Nu se știe ce avantaj implică aceste localizări.

La procariote, topoizomerazele II sunt tetrameri A_2B_2 și au 370kDa. Cele din eucariote sunt homodimere cu greutăți moleculare comparabile. Există o asemănare semnificativă a secvențelor de aminoacizi între enzimele procariotelor și cele ale eucariotelor, ceea ce indică faptul că ele ar prezenta plieri și mecanisme de acțiune asemănătoare. Cataliza relaxării moleculelor de ADN este însoțită de schimbarea conformației enzimei, pe baza energiei eliberate prin hidroliza ATP. Acesta se fixează pe enzimă, înainte de hidroliza sa. In timpul fiecărui ciclu catalitic, este hidrolizată cel puțin o moleculă de ATP.

Topoizomerazele de tip II, atât din eucariote cât și din procariote, relaxează atât ADN supraîncolăcit negativ cât și pe cel supraîncolăcit pozitiv; catenează și decatenează ADN circular dublu catenar și înnoadă moleculele dublu catenare. Topoizomeraza II din *E. coli* se numește ADN giraza. Există și alte enzime asemănătoare ADN girazei ce au capacitatea de a introduce în ADN supraîncolăciri negative.

17. MECANISMUL DE ACȚIUNE AL TOPOIZOMERAZEI II

In timpul acțiunii lor, aceste enzime clivează pe ambele catene un segment de ADN, se fixează ferm pe cele două capete ale acestui segment bicatenar, realizând un complex de forma unei breșe tranzitorii și, în același timp, se pliază peste un alt segment de ADN bicatenar intact, antrenându-l pe acesta spre a trece prin breșa din primul segment.de ADN.

Există două modele pentru mecanismul de acțiune al topoizomerazei II.

Ambele modele presupun clivarea concertantă a celor două catene ale unui segment de ADN, urmată de formarea unei porți constituite din complexul enzimă–ADN clivat. Când poarta se deschide, un segment bicatear de ADN poate intra prin ea. După aceea, poarta se închide și se reface legătura fosfodiesterică a segmentului de ADN care a fost clivat. In a doua etapă, segmentul iese din complex. Diferența între cele două modele este că unul din ele indică deschiderea unei a doua porți, care permite ieșirea ADN, în timp ce în cel de al doilea model indică o singură poartă atât pentru intrarea cât și pentru ieșirea ADN. Acest din urmă proces consumă energia provenită din clivarea ATP.

Wang și colab. (1979) au adus dovezi pentru existența unei porți sau a unei adâncituri care se deschide după hidroliza ATP și eliberează segmentul de ADN. Cu ajutorul unei molecule de ATP nehidrolizabil, care blochează enzima în conformația închisă, autorii au studiat și reacția de decatenare efectuată de ADN topoizomeraza II din drojdie. Rezultatele lor par a favoriza modelul cu două porți, deși nici modelul care presupune existența unei singure porți nu poate fi exclus.

Prin procese de acest fel, topoizomerazele permit „descurcarea“ cromozomilor replicați și relaxarea plectonemelor. Ele desfac și fac *„noduri“* în macromoleculele ADN.

18. ADN GIRAZA

Prima enzima de tip topoizomeraza II descoperită este ADN giraza din bacterii. Aceasta este capabilă să introducă o supraîncolacire negativă într-o moleculă relaxată de ADN, printr-o reacție cuplată cu hidroliza ATP. Giraza este un tetramer de tipul A_2B_2. Subunitatea A se leagă de ADN, iar subunitatea B se leagă de ATP și îl hidrolizează. Giraza este ținta acțiunii a două tipuri de antibiotice: a cumarinelor, care se leagă de subunitatea B, și a chinolonelor, care se prind de subunitatea A. Enzima formează cu ADN un complex în care 120 perechi de baze se înfășoară în jurul enzimei, formând un hiperhelix *right handed*

Studii de microscopie electronică indică faptul că giraza are o structura bilobată (în formă de inimă) și că subunitățile B formează probabil lobii proeminenți.

Tot în bacterii există o altă topoizomerază de tip II și anume topoizomeraza IV, care in vitro, are rolul de a decatena molecula cromozomală fiică, în stadiile finale ale replicării ADN.

Trebuie accentuat faptul că, pe de o parte, cunoștințele suprastructurii și funcției acestor enzime sunt rezultatul integrării rezultatelor studiilor biochimice, mecanistice și structurale ale diferitelor lor fragmente constituente, iar, pe de altă parte, ale studiilor enzimelor de diferite proveniențe. Astfel, diferite fragmente de topoizomerază I, au fost mai bine studiate la *E coli* și la eucariote, ceea ce permite aprecierea asemănărilor și diferențelor dintre aceste proteine.

În cazul topoizomerazelor II există, de asemenea, progrese rapide privitoare la structura și mecanismul lor de acțiune. Este foarte probabil că aceste enzime conțin o cavitate în centrul lor. Acest fapt permite tranziția conformațională a ADN.

Devine din ce în ce mai clar faptul că topoizomerazele I și II sunt mai asemănătoare din punct de vedere structural și funcțional, decât se părea la început. Structura capătului N terminal, de 43 kDa, al subunității B a girazei, indică posibilitatea formării unei cavități. In plus, diferite studii au indicat existența uneia sau a mai multor porți care permit intrarea și ieșirea ADN din enzimă. În sfârșit, o importanță mare a cunoașterii topoizomerazelor rezultă din faptul că ele sunt ținta unor antibiotice sau a unor medicamente antivirale, bacteriene și antitumorale.

Studiul structurii domeniului girazei de care se prinde ATP a permis sinteza unor antibiotice care se prind de acest domeniu și va permite proiectarea și a altor medicamente.

19. HELICAZELE

Helicazele sunt enzime care acționează asupra structurii helicoidale a ADN prin desfacerea celor două lanțuri ale dublului helix, jucând rol esențial în inițierea replicării ADN, în pregătirea acestuia în vederea expunerii matrițelor în replicare.

20. MODIFICĂRI CONFORMAȚIONALE ALE ADN ÎN TIMPUL TRANSCRIPȚIEI.

Exemplificăm, în cele ce urmează, modificări conformaționale ale ADN legate de expresia oncogenei *c-myc* (Kinniburg și colab., 1994).

Un marker al fenotipurilor neoplazice este alterarea diferențierii normale a celulelor hematopoietice. O reducere dramatică în expresia protooncogenei *c-myc* este necesară pentru diferențierea celulară a mai multor linii celulare hematopoietice.Intr-o linie eritroleucemică, expresia nereglată în mod susținut a genelor *c-myc*, inhibă diferențierea celulară într-un mod dependent de doză .Aceste date susțin ipoteza că gena *c-myc* este motorul proliferării, în timp ce absența acțiunii sale, permite diferențierea celulară.

In afară de factorii convenționali de transcripție, promotorul genei *c-myc* poate prinde o serie de factori de transcripție cu specificitate de secvență și de conformație. La capătul 5', care flanchează ADN *c-myc,* se găsește o secvență de 125bp. Acesta prezintă o asimetrie mare a unui lanț purin-pirimidinic care poate produce o conformație ADN-H. Acest element este sensibil la nucleaza care acționează pe ADN monocatenar, in vitro.

S-a izolat o clonă cADN pentru unul din factorii care se leagă de elementul promotor NSE *(Nuclease Sensitive Element Protein 1, NSEP1)* Această clonă prezintă proprietatea neobișnuită de a se prinde atât de secvența duplex, cât și de monocatena bogată în citozină a NSE.

S-au creat proteine mutante trunchiate de NSPE-1. Aceastea au permis definirea regiunilor duplex și monocatenă de care se leagă NSPE1. Pentru legarea de duplex, ca și pentru legarea de monocatenă, sunt necesare două grupe de aminoacizi bazici. In plus, pentru legarea doar a secvenței monocatenă a NSE este necesară o regiune octapeptidică care este asemănătoare cu un motiv consens de ribonucleoproteină. S-au efectuat experiențe pentru descifrarea rolului proteinelor NSPE în reglarea transcripțională a genei *c-myc.*

Se crede că majoritatea factorilor transcripționali se prind de elementele promotoare din ADN cu conformația B, unde porțiunea lineară determină specificitatea. Totuși, există și elemente promotoare care pot forma structuri complexe cum sunt triplexurile intramoleculare, care pot fi implicate în activitatea elementelor promotoare. S-a arătat că un element promotor *c-myc,* și anume NSE, poate forma triplexuri intramoleculare de tipul ADN-H și are motivul repetitiv de secvențe $(ACCCTCCCC)_4$

Prin producerea de mutanți și examinarea activității lor transcripționale s-a putut demonstra că aceasta din urmă ar putea fi dedusă din capacitatea mutanților de a forma triplexuri moleculare, adică de abilitatea de a forma conformația ADN-H. In cazul genei *c myc,* numărul de repetiții al perechilor de baze sau poziția și numărul de baze mutante, nu permit această deducție. Astfel, s-a demonstrat că ADN-H poate fi un participant activ, dinamic, în transcripția genei *c-myc.*

21. POLIMORFISMUL CONFORMATIONAL AL ADN MONOCATENAR *(SSCP – SINGLE STRAND CONFORMATIONAL POLYMORPHISM)*

Fragmentele monocatenare adoptă conformații pliate care cresc numărul perechilor de baze intracatenare. In mod ideal, diferențele dintre formele tridimensionale ale conformerilor monocatenă, corespunzătoare formelor sălbatice și repectiv celor mutante, dau naștere la pattern-uri electroforetice diferite care pot fi detectate și utilizate pentru identificarea speciilor de ADN care conțin mutații. Detectarea SSCP necesită matrici de separare electroforetică dense, care pot separa în mod reproductibil conformerii monocatenă formați în timpul denaturării.

Screening-ul genetic al SSCP implică o denaturare termică a unui produs PCR și o răcire rapidă urmată de elactroforeza în gel sau electroforeza capilară, în condiții nedenaturante, într-o matrice de separare cu rezoluție mare. In timpul răcirii soluției foarte diluate, unele fragmente monocatenă nu își găsesc complementul, ci colapsează, pliindu-se și formând complexe tridimensionale, determinate de structura lor primară. Alte fragmente monocatenă formează duplexuri care constau din catene perfect complementare (homoduplexuri), sau duplexuri formate din împerecheri eronate – „*mismatch*“ (heteroduplexuri). Aceste forme complexe, diferit pliate, pot fi distinse prin electroforeză, detectându-se astfel diferențele dintre secvențele ADN ale unei probe provenite de la un pacient față de cea provenită de la un martor sănătos.

Heteroduplexurile pot forma structuri secundare neobișnuite, inclusiv regiuni cu umflături (“*bubled*“) care pot rupe forma de dublu helix obișnuită.

Evidențierea heteroduplexurilor se poate face tot electroforetic, în condiții asemănătoare cu cele folosite în analiza SSCP.

22. OBȚINEREA UNOR INFORMAȚII ASUPRA CONFORMAȚIILOR ADN CU AJUTORUL UNOR ENZIME ȘI AL UNOR COMPUȘI HETEROCICLICI

Printre metodele cel mai des folosite pentru determinarea conformației ADN sunt: cristalografia, dicroismul circular, spectroscopia RMN. În cazul

ADN-Z, acesta s-a dovedit a fi puternic imunogen, ceea ce a permis elaborarea unor tehnici imunologice de evidențiere a acestei structuri.

Mai recent, grație existenței unor enzime (de exemplu a nucleazelor P_1 și S_1), specifice pentru substrate constituite din ADN monocatenar (prezente doar în conformațiile non B), s-au elaborat metode enzimatice de evidențiere a unor structuri non B prin incubarea ADN cu aceste enzime și analiza electroforetică a produșilor acestor reacții. De asemenea, prin interacția ADN cu unele droguri heterociclice colorate sau fluorescente, are loc perturbarea spectrelor corespunzătoare acestor droguri. Aceste perturbări dau indicații asupra localizării drogului pe o anumită zonă din structura ADN și permit obținerea unor informații asupra structurii acestuia.

23. DETECTAREA ENZIMATICĂ A STRUCTURILOR NON B ALE ADN PRIN EVIDENȚIEREA SITUSURILOR SENSIBILE LA ACȚIUNEA NUCLEAZEI P1 ȘI PRIN REALIZAREA ELECTROFOREZEI ÎN GEL

Această metodă a fost folosită în analiza genei PKD_1 a pacientilor cu ADPKD (*autosomal dominant polycistic kidney disease*). Anterior a fost demonstrat faptul că intronul 21 al acestei gene este predispus delețiilor și inserțiilor, de diferite mărimi (Watson și colab., 1996). De asemenea, se știe că intronul 21 al acestei gene conține un traseu polipirimidinic de 2500 perechi de baze, cel mai mare pus în evidență, până în prezent, în genomul uman (Watson.și colab.,1996).

Este cunoscut faptul că structurile „*mirror repeats*" polipurin-polipirimidinice formează triplexuri ADN in vitro și in vivo (Lee și colab., 1989, Ussery și colab., 1993), și favorizează mutageneza (Jaworski, 1989).

Blaszak și colab. (1999), au analizat tranzițiile structurale produse în ADN din intronul 21 al genei PKD1, într-un plasmid recombinant, folosind diferite modificări chimice, electroforeză bidimensională și nucleaza P_1. Ei au semnalat existența unor segmente monocatenare sensibile la acțiunea nucleazei P_1 în intronul 21 al acestei genei, prezent în plasmida recombinantă $pCW3_1$, ceea ce înseamnă implicit că ADN din acest intron este „*left handed*" (ADN „*right handed*" nu este sensibil la acțiunea nucleazei P_1, întrucât nu conține segmente monocatenare).

Sensibilitatea la acțiunea nucleazei P_1 apare doar după preincubarea la pH= 4.6. Electroforetic ea este evidențiată prin dispariția unei benzi late și apariția mai multor benzi înguste pe electroforegramă. Relaxarea tensiunii superhelicale din ADN (prin tratamentul cu topoizomerază) sau linearizarea (prin tratamentul cu EcoRI) dau naștere la structuri ADN insensibile la acțiunea nucleazei P_1, în aceleași condiții de pH. Cele arătate demonstrează că formarea structurilor non B ale ADN (singurele care conțin porțiuni monocatenare, sensibile la acțiunea nucleazei P_1), este dependentă de pH și de densitatea superhelicității. Analiza moleculelor lineare de ADN, menționate mai sus, a demonstrat că ele sunt trasee polipurin-polipirimidinice, caracterizate prin densități superhelicale modeste, în care au loc tranziții structurale, dependente de pH.

Rezultatele prezentate au condus pe autori la concluzia că regiunea intronului 21 al genei PKD1 poate participa în mecanismul mutațional care alterează alela normală din celulele tubulare ale pacienților cu boală policistică autosomal dominantă a rinichiului uman.

Traseul lung PuPy în gena PKD_1 este deosebit de favorabil pentru formarea structurilor non B, datorită lungimii sale și numărului mare de structuri potențiale care pot deriva din el. Supraîncolacirea nelimitată, importantă pentru formarea tripletelor intramoleculare, este comună și în cazul multor gene umane (Kramer și colab.,1997, Ljungeman, 1992). Remodelarea cromatinei sau transcripția pot crea, de asemenea, regiuni cu o supraîncolăcire marcată a ADN care favorizează formarea triplexurilor intramoleculare. Este clar că structurile triplex protonate pot exista in vivo (Ussery și colab., 1993) și că prezența policationilor în celule poate contribui la stabilizarea acestor regiuni protonate de ADN-H.

24. STUDIUL CONFORMAȚIILOR ADN CU AJUTORUL UNOR COMPUȘI METALICI HETEROCICLICI

Diferiți compuși heterociclici, cationi aromatici cu structură plană, se pot intercala (etaja) între perechile de baze adiacente ale duplexului (Waring și colab., 1970). Aceste droguri intercalative pot fi mutagene, iar unele dintre ele, precum adriamicina și daunomicina, servesç ca agenți chemoterapeutici puternici. Intercalatori mici, precum proflavina și bromura de etidiu, în plus, față de aceasta, au fost de mult timp folosiți ca reactivi pentru determinarea structurii ADN.

Complexele care conțin metale, se leagă de ADN tot prin intercalare. Metalointercalatorii înșiși s-au dovedit a fi deosebit de utili pentru determinarea structurii ADN, întrucât metalul poate fi ușor variat într-un mod controlat, după scopul urmărit. Cromoforul aromatic al cationului intercalativ poate fi un instrument sensibil pentru monitorizarea flexibilității conformaționale a helixului. În plus, reactivii metalointercalatori au o flexibilitate experimentală particulară, nu numai în privința metalului, dar și a liganzilor accesori, ei putând fi variați în diferite scopuri.

Intercalatorii cu platină sunt de o importanță unică ca probe electronodense pentru exprimentele de difracția razelor X. Comparația prin studii de difracție cu raze X între intercalatorul a 2,2'-bipiridil platină (II) cu speciile neintercalative analoge, a demonstrat că singura condiție necesară pentru intercalare este planaritatea ligandului.

Pe de altă parte, mulți intercalatori prezintă activități antibacteriene sau antitumorale. Dat fiind faptul că intercalatorii se aseamănă cu perechile de baze în privința formei și a grosimii lor, ei sunt mutageni „*frameshift*" Proprietatea definitorie a unui intercalator este o structură plană heterociclică (Waring, 1970)

Reiese clar importanța domeniului prezentat atât pentru proiectarea unor droguri, cât și a unor reactivi cu mare specificitate și stereoselectivitate față de anumite structuri ale ADN.

Interacțiunea ionilor metalici cu ADN, prezintă un mare interes. Se cunoaște faptul că soluțiile apoase ale unor săruri metalice interacționează cu ADN. În plus, se cunosc o serie de complecși metalici care conțin liganzi legați coordinativ și care prezintă aceeași acțiune. Printre acești este și complexul $[Co(NH_3)]_6$ care este capabil să stabilizeze ADN helicoidal în conformația Z-„*left handed*". Studiile de cristalografie cu raze X au indicat faptul că acest compus își exercită acțiunea prin forțe electrostatice și prin punți de hidrogen, legându-se de grupări localizate în fosa mare a ADN. În afară de complexul semnalat, alți compuși care conțin Cu^{+2}, ZN^{+2} și Co^{+3}, cât și liganzi de tip aminic s-au dovedit utili pentru studiul conformației ADN.

Alți complecși metalici utilizați în determinarea structurii ADN sunt cei ai tris fenantrolinei și cei de tip porfirinic.

25. INTERACȚIA ADN CU COMPLECȘII METALICI AI TRIS FENANTROLINEI

O selectivitate enantiomerică marcată a fost observată în interacțiunea diferiților complecși metalici ai tris fenantrolinei cu formele ADN răsucite spre dreapta sau spre stânga (Barton, 1990). Selectivitatea enantiomerică se bazează pe reactivitatea sau nereactivitatea dintre liganzii fenantrolinei și scheletul fosfatic al ADN.

Ionul complex tris (4,7 difenil fenantrolina) cobalt III este remarcabil din acest punct de vedere, deoarece cei doi enantiomeri ai săi se leagă de ADN cu afinități diferite, în funcție de conformația acestuia. In afară de aceasta, complexul poate fi activat fotochimic pentru a produce ruperi ale lanțurilor, identificând astfel, în mod cert, regiunile cu conformație Z ale ADN (Barton 1990).

Complecșii cu cobalt ai tris fenantrolinei pot fi folosiți ca droguri antitumorale, atât direct, în sistemele experimentale, cât și încorporate în produse farmaceutice. În ambele cazuri, sunt folosiți enantiomerii lambda ai complexului. La baza acțiunii antitumorale se află capacitatea acestor complecși de a scinda ADN. Un astfel de complex este tris fenantrolina — cobalt III. Practic, procesul de scindare este realizat în mai multe etape. În prima etapă, complexul este intercalat, formând un aduct al ADN. Ulterior, aductul intercalat este iradiat cu o doză suficientă de radiații UV, de o lungime de undă potrivită, producând o crestătură la nivelul intercalării, prin ruperea a cel puțin unei punți diesterice. În sfârșit, folosindu-se enzime potrivite, în etapa următoare, se poate scinda fie porțiunea monocatenară ADN, de la nivelul crestăturii, fie ambele lanțuri (Barton 1990).

In cazul complexului cu zinc al tris-fenantrolinei s-a costatat că izomerul delta se prinde de preferință de ADN „*right –handed*“, în timp ce izomerul lambda se prinde de preferință de ADN „*left handed*“. Pe baza acestei constatări, acești complecși pot fi folosiți pentru a identifica sensul răsucirii ADN (Barton, 1990).

In cazul izomerilor cu liganzi neintercalați au loc repulsii sterice care împiedică intercalarea.

26. INTERACȚIUNEA ADN CU PORFIRINELE

O clasă importantă de complecși care se leagă de ADN, îl clivează și în acest fel are consecințe asupra conformației ADN și asupra viabilității celulare, este constituită de diferite porfirine și metaloporfirine, distincte între ele atât prin constituenții metalici cât și prin liganzii lor. Analogi ai porfirinelor au fost studiați privitor la rolul, atât al inelului porfirinic, al constituenților metalici cât și al diferiților liganzi, în procesele studiate.

In general, porfirinele se împart în trei grupe și anume:

Clasa 1 conține porfirine care induc schimbări caracteristice agenților de intercalare în ADN, cu un conținut de peste 40% baze GC. Ele se leagă însă parțial și la suprafața moleculei (Fiel și colab., 1985; Banville și colab., 1983).

Clasa 2 conține porfirine care se leagă la exteriorul ADN și au proprietăți de auto–etajare, urmată de agregarea ADN (Carvlin și colab., 1982; Banville și colab., 1983). Un reprezentat al acestei clase este mesotetrakis (p-tri N-metil piridinium) porfirina (TMAP).

Clasa 3 (Carvlin și colab., 1982) conține porfirine care se leagă la exteriorul moleculei, atât de situsurile AT cât și de cele GC.

Cele trei clase de mai sus se deosebesc și prin modificările produse asupra ADN la nivelul vâscozității, dicroismului circular și RMN. La rândul lor, porfirinele sunt și ele modificate în urma interacțiunii lor cu ADN. Aceste modificări sunt evidențiabile prin studiul spectrelor electronice ale complexelor ADN-porfirină.

Metodele spectroscopice și spectrofotometrice pentru studiul interacțiunilor dintre ADN și porfirine, se bazează pe proprietatea ADN de a perturba spectrele de absorbție ale porfirinelor, care se plasează fie între lanțurile helixului sau/și la suprafața acestuia, de preferință în fosele macromoleculei. (Fiel și colab., 1979)

Cercetările efectuate cu ajutorul porfirinei tetracationice solubile în apa, meso-tetrakis (N-metil-4–piridiunim (Fiel și colab., 1985) au demonstrat că acest compus și analogii săi se pot lega de ADN. Ulterior s-a demonstrat că modul în care ei se leagă de ADN este dependent de structura liganzilor porfirinelor și de geometria de coordinare a metalelor. In procesul de legare pot fi implicate, și în acest caz, atât intercalările cât și legarea exterioară, pe suprafața dublului helix. Aceste fapte, împreună cu observația că acești compuși pot fi activați chimic și fotochimic pentru a produce scindări ale ADN subliniază importanța lor pentru studiul structurii ADN.

S-a demonstrat că unele pofirine, de exemplu cele cu Zn, se leagă la exteriorul ADN, de regiunile bogate în AT, iar unii complecși cu alte metale (Ni și Cu) se leagă atât cu regiunile AT cât și cu cele GC, din fragmentele de restricție ale ADN din pBR322.

Date interesante în studiul spectral al complexelor ADN-porfirine s-au obținut și prin utilizarea compusului hibrid porfirină cu zinc-elipticina (Sentagne și colab., 1994). În acest caz, s-a demonstrat că elipticina se intercalează între lanțurile duplexului, iar porfirina rămâne în afara polimerului. S-a demonstrat că prezența ADN are un puternic efect hipocrom asupra benzii datorate cromoforului elipticinei (450 nm), și o puternică creștere a fluorescenței, datorate porfirinei, evidențiate prin spectroscopia de fluorescență (600–700nm).

In cazul interacțiunii cu ADN din timusul de vițel apar, în plus două maxime de absorbție la 612 și la 660 nm. În cazul unor analogi ai complexului hibrid amintit, în contactul cu ADN, apar și shifturi batocrome ale maximelor de absorbție ale colorantului. Este de presupus că aceste efecte optice se datoresc, în cea mai mare parte, intercalării elipticinei, prin interacțiunea sistemului π-aromatic al acesteia cu bazele azotate din nucleotidele acidului nucleic. Această interacțiune depinde de gradul de suprapunere al constituentului elipticină cu bazele azotate și variază la diferiții analogi ai moleculei hibride care interacționează cu ADN.

27. INTERACȚIUNEA ADN CU ALBASTRU DE METILEN

Pe același principiu, al perturbării spectrului de absorbție al unui compus cu grupări cromofore, se bazează și metoda spectrofotometrică a evidențierii formării unui complex între ADN și albastrul de metilen.,

Spre deosebire de interacțiunea dintre porfirine și ADN demonstrată, în general, doar prin efectul hipocrom, la nivelul benzii Soret, interacțiunea dintre albastru de metilen și ADN se poate demonstra prin efectul acestei interacțiuni, atât la nivelul celor două maxime de absorbție ale colorantului

(614 și 664 nm). cât și la nivelul absorbanței ADN la 260nm În plus, s-a demonstrat că monomerii de colorant (DO_{614}) se intercalează preferențial între lanțurile duplexului, iar dimerii de colorant (DO_{664}) se leagă preferențial la suprafața ADN, mai ales în fosa mică a dublului helix.

Dat fiind faptul că flexibilitatea ADN, ce permite tranziția sa de la o conformație la alta, este reflectată și de variația dimensiunilor foselor. Dumitrescu și Gavrilă (2000), au arătat că variația interacției colorantului cu ADN, reflectată de curbele de absorbție, ar putea indica prezența unor conformații diferite ale ADN. Această presupunere a fost verificată prin studiul interacțiunii albastrului de metilen cu ADN provenit din celule supuse stress-ului oxidativ, care după cum se cunoaște poate altera conformația ADN, comparativ cu interacția colorantului cu ADN din celule care nu au suferit un astfel de stress. Acest rezultat a fost confirmat prin studiul electroforetic al complexului ADN cu iodura de propidiu prin care autorii au demonstrat că în urma stress-ului oxidativ are loc, în prezența colorantului cationic fluorescent, în exces, formarea unui complex cu migrare catodică diferită de cea a complexului format cu ADN din celulele martor, datorită încărcării diferite cu colorant a suprafețelor moleculelor cu conformații diferite.

28. CONSIDERENTE ASUPRA INTERACȚIUNII FOSEI MICI A ADN CU DIFERITE DROGURI

Prin diferite studii efectuate prin analize RMN și *footprinting* (tehnică ce permite identificarea situsurilor unde sunt legate proteinele de ADN), s-a demonstrat că lărgimea fosei mici, alături de legăturile de hidrogen specifice fosei mici, (formate între scheletul fosforic și muchiile bazelor dintre lanțurile care formează podeaua fosei mici), are un rol major în legarea diferitelor droguri de anumite secvențe particulare.

Studiul cristalografic al interacțiunilor necovalente ale fosei mici cu ligandul cationic Hoechst 33258 (Ayami și colab., 1999) a fost efectuat pe un model constând din anumite polinucleotide dodecamerice sintetice, non autocomplementare și care formează o structură dublu catenară helicoidală cu fosa mică, foarte îngustă, a polinucleotidului. Autorii au demonstrat că ligandul cationic a lărgit cu 0,8Å partea centrală a fosei la nivelul regiunii mici, bogată în AT, și a produs schimbări mici ale răsucirii helixului și a rotației relative a unei baze dintr-o pereche în raport cu cealaltă bază, în jurul axei lungi (*proppeller*). Acesta din urmă a indicat o desrăsucire cu 15 grade a AT centrale, necesară pentru a realiza un registru izohelical compatibil cu structura formată între muchiile bazelor și drog, prin intermediul punților de hidrogen, proveniți de la drog, și bazele ADN. Deși punțile de hidrogen nu constituie forța cea mai mare, în stabilizarea complexului ADN-drog, ele au un rol de sită în poziționarea optimă a drogului în situsul de legare din ADN.

Din cele expuse, rezultă ideea interdependenței sterice dintre structurile polinucleotidului și ale drogurilor. Reiese că modificarea conformației polinucleotidului va fi reflectată de modificările fizico-chimice ale drogurilor (spectre de absorbție, de ex), care pot deveni în acest fel, reactivi pentru determinarea modificărilor conformaționale ale ADN.

CAPITOLUL VIII

PROTEINE CU DOMENII DE LEGARE SPECIFICE LA ADN

1. INTRODUCERE

Informația din ADN este organizată, replicată și citită cu ajutorul proteinelor care interacționează în mod diferit cu ADN. La eucariote, capacitatea de exprimare a proteinelor bioactive necesită mecanisme de control ce acționează la următoarele nivele:

1). structura cromatinei. Aceasta poate influența accesul factorilor transcripționali și a ARN polimerazei la nivelul genelor specifice, permițând sau nu activarea lor transcripțională;

2). inițierea transcripțională reprezintă cel mai important mod de control al expresiei genelor la eucariote; această etapă depinde de tăria promotorului, prezența sau absența enhancer-ului (crește activitatea ARN polimerazei la nivelul promotorului respectiv, prin legarea factorilor de transcriere specifici) și interacția dintre factorii activatori și inhibitori;

3). procesarea și modificările transcriptului: bonetare, poliadenilare, splicing;

4). transportul ARN în citoplasmă este un proces complex în urma căruia ARNm părăsește nucleul;

5). stabilitatea transcriptului, este mult mai variabilă la eucariote comparativ cu procariotele; perioada de înjumătățire a ARNm la procariote este de aproximativ 1–5 minute;

6). inițierea translației; deși ARNm poate avea numeroase exemplare ale codonului pentru Met (*AUG*), ribozomul are capacitatea de a recunoaște corect codonul *AUG* de inițiere de la care inițiază sinteza catenei peptidice;

7). modificări posttranslaționale; acestea pot fi reprezentate de formarea punților disulfidice, acetilare, glicozilare etc.

8). transportul proteinelor la locul de acțiune;

9). controlul stabilității proteinelor.

Principalul mecanism de control al sintezei proteinice la eucariote se realizează la nivelul etapei de inițiere a transcripției. Transcripția la eucariote este realizează cu ajutorul a trei tipuri de ARN polimeraze, desemnate *I*, *II* și *III* sau α, β *și* γ. Cel mai complex mecanism de control, dintre cele prezentate anterior, este cel ce reglează transcripția genelor structurale. Cele mai multe asemenea gene conțin un promotor bazal, alcătuit din cutiile *TATA* (localizat la –20 pb de situsul start transcripțional) și *CCAAT* (localizat la –50 – 130 pb de situsul start transcripțional). Proteinele identificate ca *TFII A, B, C* (de la *Transcriptions Factors regulating RNA pol II*) interacționează cu *TATA* box, iar proteinele *C-EBP* (de la *CCAAT box / Enhancer Binding Protein*) se leagă la elementul *CCAAT*.

Caracterizarea factorilor transcripționali ce reglează *ARN pol II*

Factor transcripțional (abreviere)	Compoziție	Funcție
TFIIA (II A)	2 sau 3 subunități	Stabilizează legarea *TFII* la promotor
TFIIB (II B)	1 subunitate	Asigură interacția dintre *TFIID* și *ARNpol II/ TFIIF*
TFIID (II D)	*TBP (TATA box binding proteins, proteine de legare la cutia TATA)*	Legare la cutia *TATA*
	8-10 TAF_{II} *(proteine asociate TBP)*	Interacția cu elementele promotorului și cu factori transcripționali specifici
TFIIF (II F)	2 subunități	Asemănător factorului σ de la procariote. Proteina facilitează legarea *ARN pol II* la promotor
TFIIE (II E)	2 subunități	Necesar pentru stimularea transcripției. Recrutează *TFIIH* și desface ADN
TFIIH (II H)	Complex	Activitate kinazică și helicazică. Rol în ciclul celular, repararea ADN

Acești factori acționează secvențial:

1 Formarea complexului *DAB (factorii IID, IIA, IIB)*

Factorul *IID* se leagă de ADN, la nivelul promotorului. *TBP*, parte din *IID*, are capacitatea de a se lega singur la promotorii care conțin cutia *TATA*. În cazul promotorilor fără cutia *TATA*, care au altă secvență de inițiere a transcrierii, legarea necesită factorul TAF_{II}. La promotorii care conțin cutia *GC*, sunt necesari *TBP*, TAF_{II} și un factor denumit *SP1* care se leagă la cutia *GC*. Aceste situații sunt prezentate în figura de mai jos:

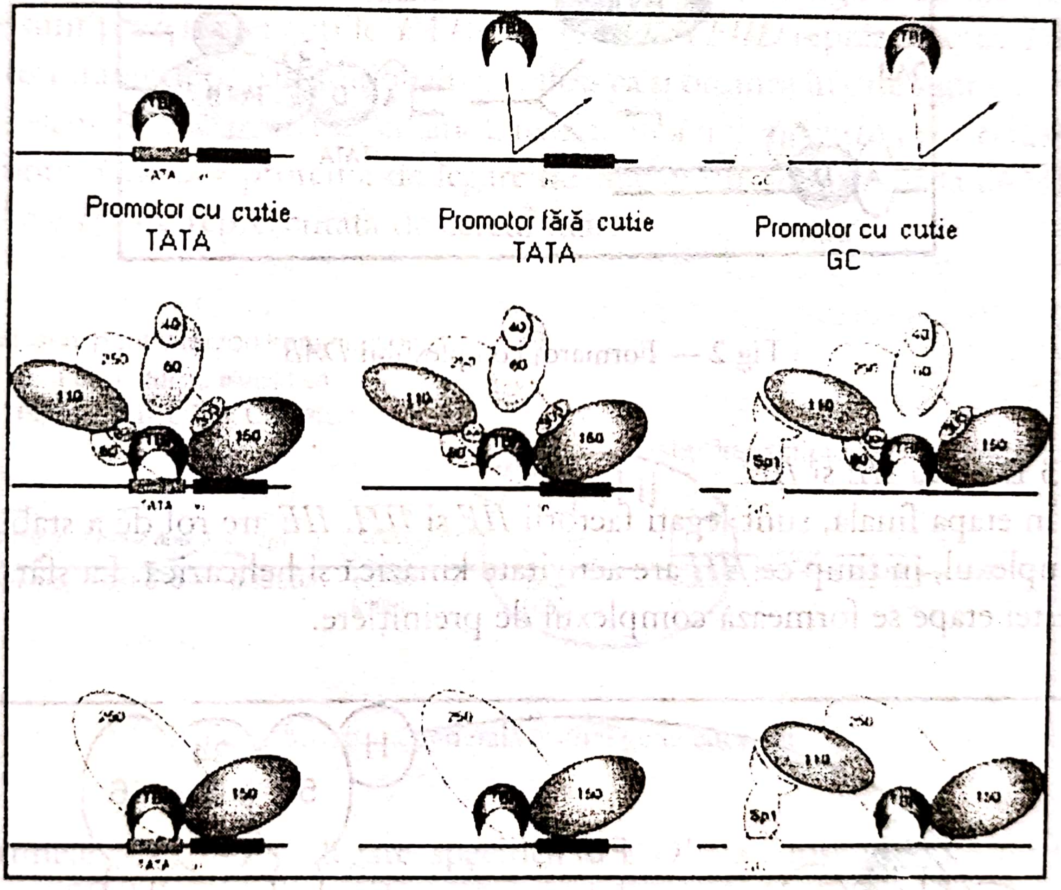

TBP
TATA
Promotor cu cutie TATA
Promotor fără cutie TATA
Promotor cu cutie GC
GC
40
250
60
110
80
150
Sp1

Fig. 1 — Formarea complexului *DAB*

2. Legarea complexului *ARN-pol II-IIF.*

Factorul *IIF* se asociază cu *ARN-pol II*, într-o manieră similară factorului sigma, de la procariote. Un model pentru formarea acestui complex este prezentat în figura următoare.

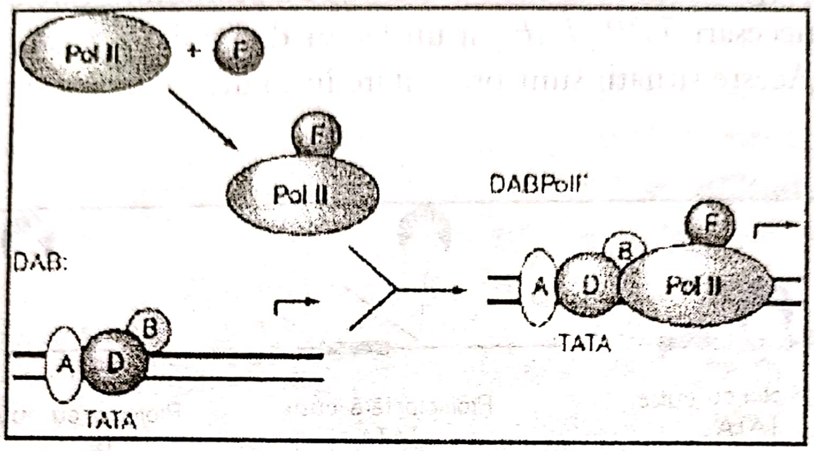

Pol II
+
F
F
Pol II
DABPolF
DAB:
B
A
D
TATA
F
B
A
D
Pol II
TATA

Fig 2 — Formarea complexului *DAB*

3 Legarea *IIE* și *IIH*

În etapa finală, sunt legați factorii *IIE* și *IIH*. *IIE* are rol de a stabiliza complexul, în timp ce *IIH* are activitate kinazică și helicazică. La sfârșitul acestei etape se formează complexul de preinițiere.

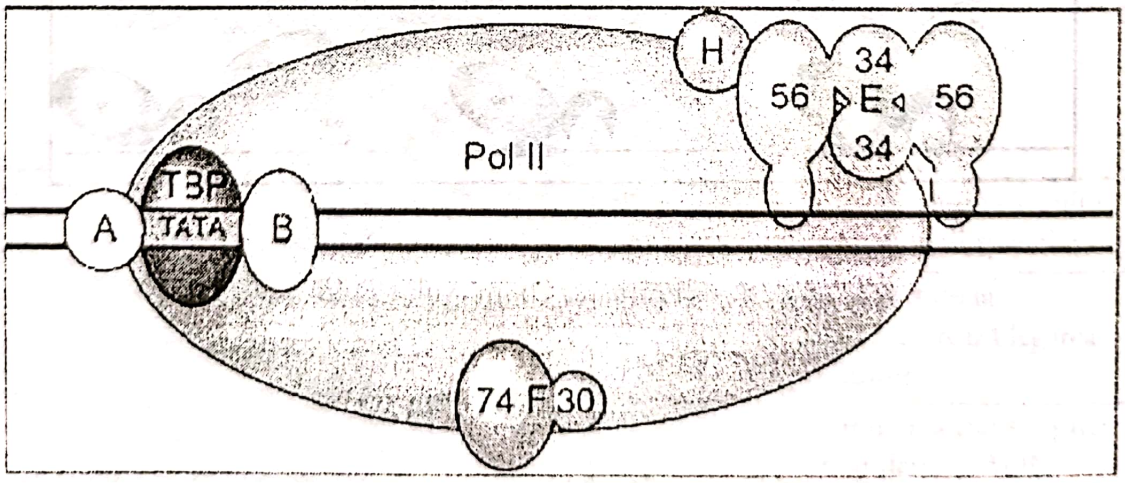

H
34
56
E
56
34
Pol II
TBP
A
TATA
B
74
F
30

Fig. 3 — Complexul de preinițiere.

4 Elongarea. Factorul denumit *TFIIS* stimulează activitatea de elongare a ARN pol II.

Promotorii conțin și alte secvențe reglatoare care leagă diferiți factori transcripționali. Aceste secvențe reglatoare sunt localizate predominant în amonte de situsul start transcripțional și mai puțin în interiorul genei sau în aval de aceasta. Numărul și tipul elementelor reglatoare și combinațiile factorilor transcripționali exercită efecte reglatorii diferite la nivelul inițierii transcripției.

Structura unei gene eucariote tipice, ipotetice, transcrisă într-un ARNm, care are doi exoni și un singur intron este schițată în figura de mai jos, unde sunt prezentate: cutiile *TATA* și *CCAAT*, *TFIID* reprezentat ca *TBP* și factori transcripționali adiționali. Localizarea și ordinea în care sunt plasate aceste elementele este una schematică, nefiind una tipică pentru toate celulele eucariote. *CREB* = proteina de legare de elementul de răspuns la cAMP; *ARN pol II* este reprezentată de cercul mare.

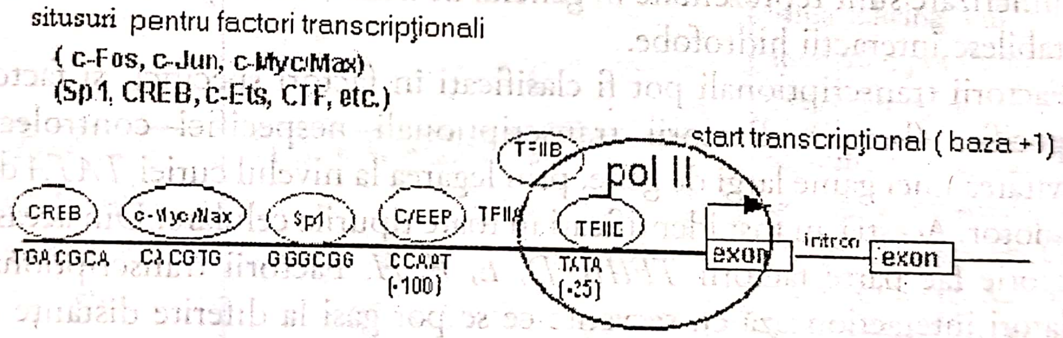

situsuri pentru factori transcripționali
(c-Fos, c-Jun, c-Myc/Max)
(Sp1, CREB, c-Ets, CTF, etc.)
start transcripțional (baza +1)
TFIIB
pol II
CREB
c-Myc/Max
Sp1
C/EBP
TFIIA
TFIID
TGACGCA
CACGTG
GGGCGG
CCAAT
(-100)
TATA
(-25)
exon
intron
exon

Fig 4 Structura generală a unei gene eucariote

Primele proteine cu legare specifică la ADN au fost identificate la bacterii, fiind reprezentate de: represorul lactozei, la *E.coli*, represorul bacteriofagului λ, proteina cro, etc. și ulterior la eucariote (ex. antigenul T al SV_{40}, factorul transcripțional *TFIIIA* și receptorul pentru hormonii steroizi).

O categorie aparte de proteine cu legare specifică la ADN este reprezentată de factorii transcripționali.

Analiza factorilor transcripționali a evidențiat că secvențe specifice de aminoacizi au roluri caracteristice, intervenind în oligomerizare, în legarea la ADN a represorilor sau a coactivatorilor etc. Structura unui activator transcripțional presupune trei tipuri de domenii: domeniul de legare la ADN, domeniul de activare transcripțională și domeniul de dimerizare. Domeniul de legare la ADN se atașează de acesta la nivelul promotorului sau enhencer-ului, la nivelul curburilor din ADN (mai frecvent la curbura majoră). Poziționarea corectă a factorilor transcripționali la ADN, necesită formarea unor contacte cheie, între un aminoacid cheie și scheletul glucidofosforic al ADN. Formarea acestor legături este obligatorie, chiar dacă secvența de aminoacizi este aliniată corect la secvența ADN corespunzătoare. Domeniul de legare de ADN poate avea motive Zn finger, homeodomenii sau regiuni bazice. Domeniile de activare transcripțională, la rândul lor, pot fi de trei tipuri: domenii acide (conținut crescut în aminoacizi cu caracter acid, de exemplu: acidul glutamic, acidul aspartic), domenii bogate în glutamină (aproximativ 25% din secvența de aminoacizi este reprezentată de glutamină), și domenii bogate în prolină. Aceste domenii interacționează cu componente ale complexului transcripțional. Domeniile de dimerizare sunt reprezentate în general de helixuri amfipatice între care se stabilesc interacții hidrofobe.

Factorii transcripționali pot fi clasificați în factori specifici și factori nespecifici (bazali). Factorii transcripționali nespecifici controlează activitatea unei game largi de gene, prin legarea la nivelul cutiei *TATA* din promotor. Aceștia au fost identificați în toate tipurile celulare. Din această categorie fac parte factorii *TFIIB, D, E, F, H.* Factorii transcripționali reglatori interacționează cu secvențe ce se pot găsi la diferite distanțe de situsul start transcripțional. Ei modulează activitatea genelor cu specificitate de țesut sau etapă de dezvoltare.

Câteva exemple de factori transcripționali sunt prezentate în tabelul din paginile următoare.

La factorii transcripționali s-au descris domenii și motive structurale. Domeniile au fost definite ca fragmente peptidice care se pliază corect, chiar și în absența celorlalte secvențe din lanțul polipeptidic, iar motivele sunt structuri peptidice conservate care nu se pot plia independent de restul proteinei. Unele motive structurale sunt conservate și se regăsesc chiar la specii foarte îndepărtate filogenetic. Pe baza prezenței lor, factorii transcripționali au fost grupați în superclase, clase și familii. Principalele superclase sunt reprezentate de factori care conțin motive cu zinc, factori cu domenii bazice, factori cu domenii Helix-Turn-Helix.

Factorul transcripțional	Secvența recunoscută	Observații:
c-Myc și Max	CACGTG	*C-Mic* a fost identificat inițial ca oncogenă retrovirală. *Max* este asociat specific cu *c-Myc* intracelular.
c-Fos și c-Jun	TGAC/GTC/AA	identificați inițial ca oncogene retrovirale; prin asocierea intracelulară formează complexul *AP1.*
CREB	TGACGC/TC/AG/A	se leagă de elementul de răspuns la cAMP; aparține unei familii cu mai puțin de 10 factori codificați de gene diferite sau rezultați în urma splicing-ului alternativ; pot forma dimeri cu *c-Jun.*
c-ErbA (receptorul pentru hormoni tiroidieni)	GTGTCAAAGGTCA	identificat inițial ca oncogenă retrovirală; este membru al superfamiliei de receptori hormonali steroid-tiroid; leagă hormonii tiroidieni.
c-Ets	G/CA/CGGAA/TGT/C	inițial a fost identificat ca oncogenă virală; predomina în celulele T și B
GATA	T/AGATA	specific celulelor eritroide, *GATA1 – 6.*
c-Myb	T/CAACG/TG	identificat inițial ca oncogenă retrovirală; factor specific celulelor hematopoietice.
Myo D	CAACTGAC	controlează diferențierea musculară

Factorul transcripțional	Secvența recunoscută	Observații:
NF-(kappa)B și *c-Rel*	GGGAA/CTNT/CCC (N=orice bază din ADN)	ambii factori au fost identificați independent; *c-Rel* a fost identificat ca oncogenă retrovirală; predomină în celulele T și B
RAR (receptorul de acid retinoic)	ACGTCATGACCT	se leagă de *RARE* (elemente de răspuns la acidul retinoic) și de situsurile *c-Jun/c-Fos*
SRF (factorul de răspuns la ser)	GGATGTCCATATTAGGACATCT	este prezent în gene care sunt induse de factorii de creștere din ser

2 SUPERCLASA FACTORILOR TRANSCRIPȚIONALI CARE CONȚIN MOTIVE CU ZINC

Proteinele cu motive *Zn finger* au fost descoperite inițial la *TFIII A*, în ovocitele de *Xenopus laevis*. Caracteristica structurală a acestei categorii de factori transcripționali o reprezintă existența unui ion de Zn^{++} (sau doi în unele cazuri), ce interacționează cu proteina, determinând formarea unor structuri asemănătoare unui deget, denumite „Zn finger" („degete de zinc").

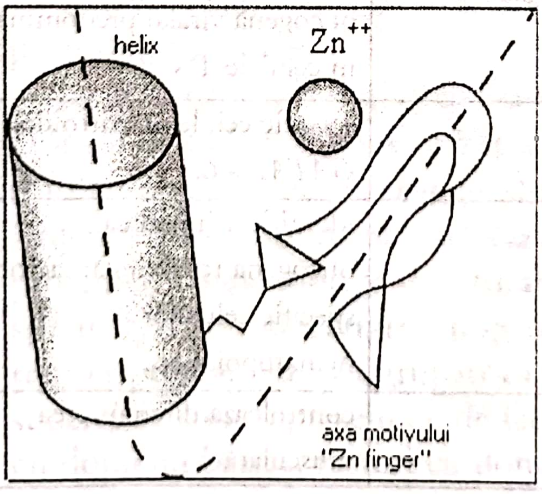


Fig 5 — Reprezentarea schematică a motivului Zn finger

Ionii de Zn^{++} au rol în stabilizarea structurii spaţiale a motivelor. Ulterior, s-a observat că ionii de Zn^{++} se pot lega de diferiţi aminoacizi. In funcţie de tipul şi numărul acestor aminoacizii, această superclasă a fost subîmpărţită în clasele: C_2H_2, C_4, C_6. Pentru a interacţiona cu ADN, vârful motivului se plasează în adâncitura majoră.

2.1. CLASA C_2H_2

Această clasă cuprinde motivele „*Zn finger*" originale. Ea a fost descoperită la factorul transcripţional *TFIIIA*, în ovocitele de *X. laevis*. Motivul este alcătuit din aproximativ 30 de aminoacizi şi un Zn^{++} legat de 2 cisteine din catena antiparalelă β (C_2) şi 2 histidine (H_2), din α helix. Secvenţa consens a motivului este:
$o x \mathbf{C} x_{2-4} \mathbf{C} x_3 o x_5 o x_2 \mathbf{H} x_{3-4} \mathbf{H} x_{2-6}$, unde „o" reprezintă un aminoacid hidrofob, „x" un aminoacid cu caracter variabil, „C" -Cisteina şi „H"-Histidina. Poziţia celor patru aminoacizi este conservată, ei fiind definitorii pentru structura acestei clase de motive „*Zn figer*". Lanţul delimitat de aminoacizii conservaţi formează o buclă, asemănătoare unui ac de păr. Denumirea clasei provine de la aceşti aminoacizi conservaţi (C_2H_2) şi de la aranjamentul spaţial al acestor elemente („degete de Zn" sau „*Zn finger*").

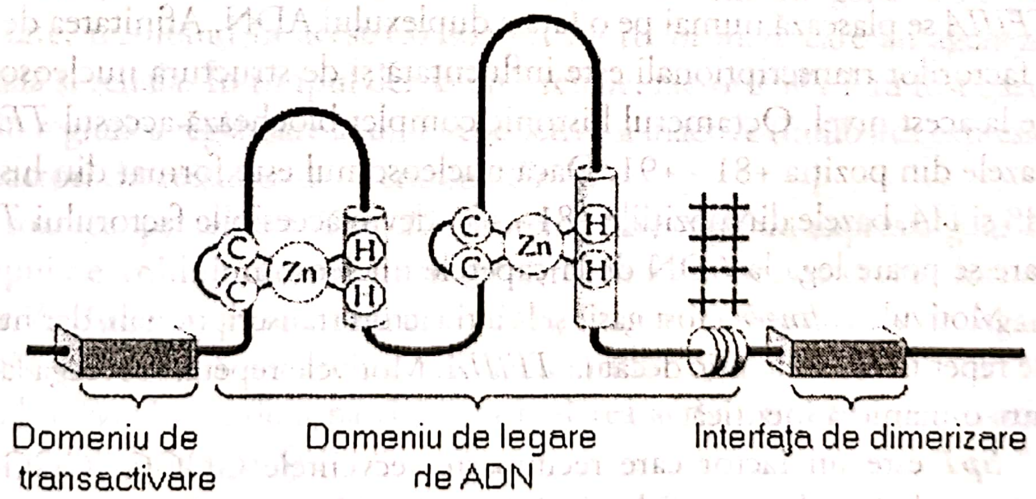


Fig 6 — Domeniile funcţionale ale unui factor transcripţional cu domenii *Zn finger*. (C = Cisteină, H = Histidină)

În funcție de răspândire, factorii transcripționali se pot clasifica în ubicvitari și specifici. Din clasa factorilor transcripționali ubicvitari fac parte *TFIIIA, Spi*.

TFIIIA are o greutate moleculară de 39kDa și este necesar inițierii transcripției genei pentru ARNr 5S. Prin legarea TFIIIA de ARN 5S, rezultă particule ribonucleoproteinice de 7S. Ca monomer, acest factor transcripțional recunoaște o secvență de aproximativ 50 de nucleotide, localizată la nivelul regiunii de control a genei pentru ARN 5S.

TFIIIA conține 9 motive „Zn finger" repetate; fiecare motiv fiind alcătuit din aproximativ 30 de aminoacizi ce recunosc o secvență de 3-5 perechi de baze azotate.

Motivele *„Zn finger"* din fiecare extremitate a *TFIIIA* se leagă de ADN. Primele trei motive se leagă la promotorul genei pentru ARN 5S, iar ultimile două au rol în poziționarea factorului la nivelul secvenței corespunzătoare din ADN. Acestea înconjoară adânciturile majore ale ADN. Motivele centrale *Zn finger* ale *TFIIIA* se așează paralel cu duplexul ADN, iar aminoacizii din α helixurile care interacționează cu bazele azotate formează un lanț continuu, la nivelul adânciturilor majore, plasat pe o singură față a duplexului ADN. Aceste motive au afinitate de legare mai mare pentru ARN, decât pentru ADN.

Contactele dintre *TFIIIA* și gena pentru ARN 5S, între pozițiile +51 - +61 și+81 - +91 sunt esențiale pentru actvitatea sa. Între aceste contacte, *TFIIIA* se plasează numai pe o față a duplexului ADN. Afinitatea de legare a factorilor transcripționali este influențată și de structura nucleosomilor, de la acest nivel. Octamerul histonic complet blochează accesul *TFIIIA* la bazele din poziția +81 - +91. Dacă nucleosomul este format din histonele H3 și H4, bazele din pozițiile +81 - +91 devin accesibile factorului *TFIIIA*, care se poate lega la ADN de la capetele nucleosomului.

Motivul *Zn finger* a fost găsit și la alți factori transcripționali, dar numărul de repetiții este mai mic decât la *TFIIIA*. Motivele repetate se leagă la ADN într-o manieră identică.

Sp1 este un factor care recunoaște secvențele GGGGCGGGGC și secvențele înrudite (*GC-box*). A fost identificat în celulele HeLa, ca un factor derivat care activează selectiv transcripția in vitro, de la promotorii SV40, și se leagă de cutii multiple GC, în elementele repetitive de 21 pb ale SV40. Specificitatea de legare la ADN este conferită de motivele *Zn finger*, in timp ce o regiune diferită a *Sp1* controlează afinitatea acestei legări.

Dintre factorii transcripționali specifici, mai cunoscuți amintim factorii *Kruppel, Hunchback, WT-1*. Acești factori transcripționali aparțin aceleiași familii de reglatori ai dezvoltării și ai ciclului celular.

Factorul transcripțional ***Hunchback*** prezintă două regiuni: una cu patru motive Zn finger iar cealaltă cu două. Aceste regiuni au funcții diferite. Acest factor transcripțional controlează activitatea elementului structural *Kruppel*.

Factorul transcripțional ***Kruppel*** este implicat în controlul procesului de segmentare la *Drosophila*. Capetele $-NH_2$ și -COOH terminale ale proteinei au structură globulară, iar regiunea centrală conține 5 motive Zn finger, fiecare motiv fiind alcătuit din 28 resturi de aminoacizi. Vârful acestor motive este bogat în aminoacizi bazici. Resturile de Lizină, Histidină și Treonină interacționează cu grupările fosfat, iar Asparagina, cu bazele azotate. Secvența specifică de ADN recunoscută de *Kruppel* este AACGGGTTAA. Acest factor transcripțional poate interacționa cu propria genă, cu propriul ARNm dar și cu alte gene implicate în procesul segmentării de la *Drosophila*.

Factorul transcripțional ***WT1*** este un factor critic în formarea gonadelor și rinichilor la mamifere. Proteina *WT1* conține patru regiuni Zn finger și se exprimă în timpul formării gonadelor și rinichiului. Oamenii cu o alelă *WT1* mutantă (obișnuit deleția regiunii Zn finger) au malformații urogenitale și dezvoltă tumori Wilms. La șoareci, ambele gene *WT1* pot fi deletate, rezultând în acest caz șoareci morți *in utero* care au agenezie gonadală și renală. În timpul dezvoltării renale, factorii *WT1* au fost găsiți legați în regiunea reglatoare a unor gene active și inactive (inhibarea expresiei unor factori de creștere, de exemplu *IGF2*).

La șoarece, proteinele *Krox 20* (proteina care reglează expresia genelor în timpul dezvoltării creierului) și *Egr-1*(rol în formarea macrofagelor) au motive Zn finger pentru legarea de ADN. Structura domeniilor de legare la ADN este asemănătoare cu cea a factorului *Sp1*. Una din funcțiile factorului *Egr-1* este de a participa la reglarea activității unor gene, prin legarea competitivă cu *Sp1*.

2.2 CLASA C_4

Primii membri descoperiți din această clasă au fost receptorii pentru hormonii steroidici și molecule asemănătoare acestor hormoni. Factorii transcripționali din această clasă prezintă un domeniu alcătuit din aproximativ 70 de aminoacizi și doi ioni Zn^{++} . Fiecare ion de Zn^{++} este legat la patru Cisteine (de unde denumirea C_4), două la începutul și două la sfârșitul buclei. Resturile de aminoacizi apropiate de capătul primei bucle determină specificitatea pentru ADN, iar cele din vârful celei de a doua bucle sunt implicate în realizarea contactelor dimerice (*D-box*). Cele două helixuri ale domeniului sunt întretăiate la aproximativ 90°.

Din această clasă fac parte familiile receptorilor hormonali pentru steroid, factori asemănători hormonilor tiroidieni și alți factori C_4, cu motive *Zn finger* (ex. familia factorilor transcripționali *GATA*) .

2.2.1 SUPERFAMILIA RECEPTORILOR NUCLEARI ZN FINGER C_4

Liganzii receptorilor nucleari sunt reprezentați de hormoni steroidici (estrogeni, progesteron, testosteron și cortizon) și lipide nesteroidice (acid retinoic, tiroxină, vitamină D). Hormonii steroidici cresc activitatea transcripțională la nivelul unui set specific de gene. Interacția ligand receptor are loc intracelular. După ce hormonul a intrat în celulă, acesta se leagă de receptorul proteinic, modificându-i conformația, astfel încât, acesta să poată intra în nucleu, unde se leagă de o secvență particulară de ADN.

Situsul ADN țintă pentru receptorii nucleari este o secvență repetitivă localizată în regiunea promotor sau enhancer, denumită element de răspuns la hormon (*HRE*) sau element de răspuns la acidul retinoic (*RARE*). Asemenea secvențe au fost descoperite în promotorul *MMTV*, fiind ținte pentru receptorul glucocorticoid. Modelul are o secvență principală de 5-6 nucleotide, un spațiator de lungime variabilă și o repetiție (directă sau inversă) a secvenței principale. Numărul de nucleotide dintre aceste secvențe repetate asigură specificitatea funcțională a acestor factori transcripționali.

Membrii familiei hormonilor glucocorticoizi (cortizon, hidrocortizon și hormonul sintetic dexametazonă) se leagă de **receptorul pentru hormon glucocorticoid**. Complexul ligand-receptor se leagă de elementele de răspuns la glucocorticoid (*GRE*) din ADN. Rolul fiecărei regiuni din receptor a fost determinat prin analiza mutațiilor în fiecare din aceste regiuni provenite de la diferiți receptori.

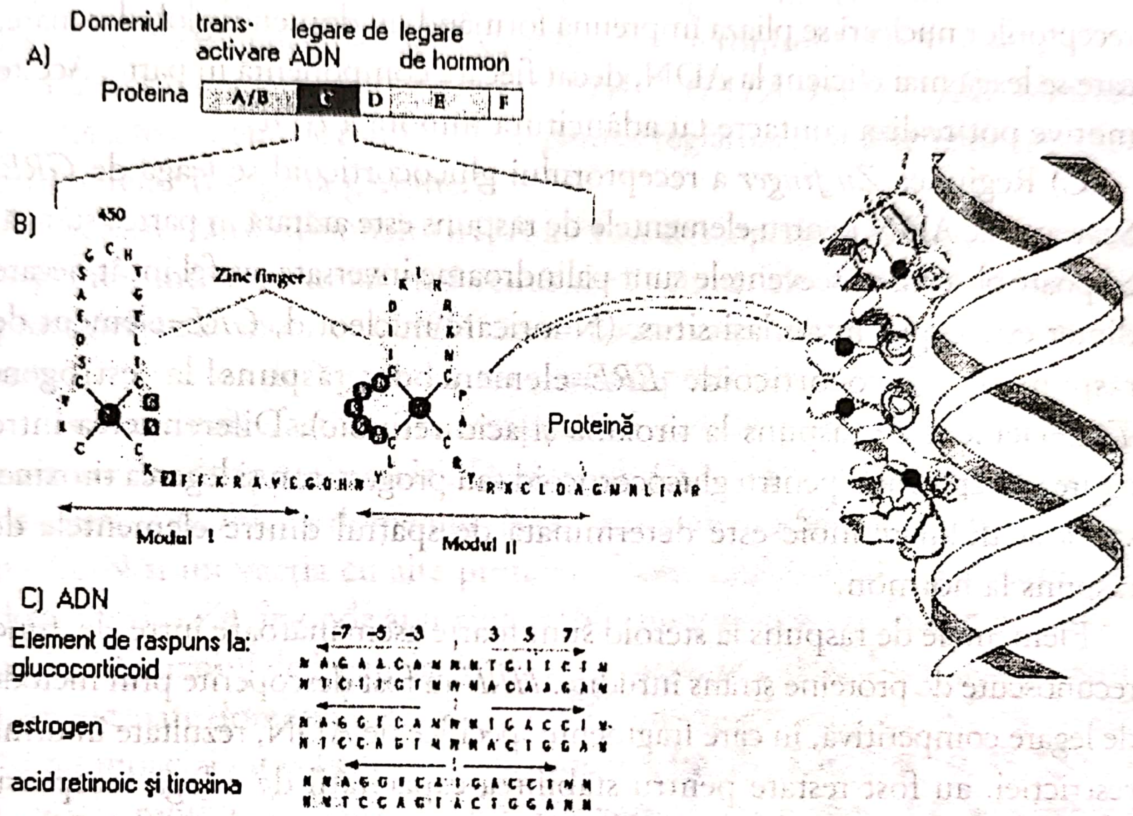

A)
Domeniul
trans-activare
legare de ADN
legare de hormon
Proteina
A/B
C
D
E
F
B)
450
Zinc finger
Proteină
Modul I
Modul II
C) ADN
Element de raspuns la: glucocorticoid
estrogen
acid retinoic și tiroxina
-7 -5 -3 3 5 7
NAGAACANNNTGTTCTN
NTCTTGTNNNACAAGAN
NAGGTCANNNTGACCTN
NTCCAGTNNNACTGGAN
NNAGGTCATGACCTNN
NNTCCAGTACTGGANN

Fig 7 — Organizarea structurală a receptorului hormonal și legarea sa la ADN

A) Structura generală a receptorului hormonal. Receptorii nucleari prezintă la capătul -NH_2 terminal o secvență de aminoacizi necesară pentru activarea genelor, urmează domeniul de legare la ADN și un scurt traiect în α helix. La capătului -COOH terminal se găsesc regiuni implicate în interacția cu liganzii, în dimerizare, precum și o a doua regiune de activare transcripțională.

B) Regiunea de legare la ADN a motivului *Zn finger* din receptorul glucocorticoid, este alcătuit din aproximativ 65 aminoacizi. Dintre acești aminoacizi, opt sunt Cisteine, cu poziție conservată, care sunt legate de doi ioni de Zn. În această regiune se formează două motive Zn finger. Structura terțiară a regiunii formează două structuri asemănătoare motivului Zn finger de la *TFIIIA*, dar aceste motive nu sunt independente structural și funcțional. Resturile de aminoacizi din modelul I, așezate în pătrat, discriminează între elementul de răspuns la estrogen și glucocorticoid. Resturile încercuite din modelul II sunt implicate în dimerizare. Motivele receptorilor nucleari se pliază împreună formând un domeniu globular mare, care se leagă mai eficient la ADN, decât fiecare componentă în parte. Aceste motive pot realiza contacte cu adâncitura minoră a ADN.

C) Regiunea *Zn finger* a receptorului glucocorticoid se leagă de *GRE*. Secvența de ADN pentru elementele de răspuns este arătată în partea stângă. Se poate observa că secvențele sunt palindroame inversate, astfel încât fiecare dimer este expus în același situs. (N=oricare nucleotid, *GRE*=element de răspuns la glucocorticoid, *ERE*=element de răspuns la estrogen, *TRE*=element de răspuns la tiroxină și acid retinoic). Diferențierea între legarea receptorului pentru glucocorticoid sau progesteron și legarea tiroxinei sau a acidului retinoic este determinată de spațiul dintre elementele de răspuns la hormon.

Elementele de răspuns la steroid sunt foarte asemănătoare între ele, fiind recunoscute de proteine strâns înrudite. *HRE* au fost descoperite prin metode de legare competitivă, în care fragmente specifice de ADN, rezultate în urma restricției, au fost testate pentru stabilirea capacității de a lega receptorii hormonali, purtători ai unui hormon marcat radioactiv. Utilizând diferite enzime de restricție, au fost obținute fragmente de ADN care au fost comparate între ele. S-a observat că secvența diferitelor *GRE* este AGAACANNNTGTTCT, unde N poate fi oricare nucleotid. S-a demonstrat că această secvență de legare a glucocorticoidului acționează ca un *enhancer*: când *GRE* a fost legat la o genă care în mod normal nu este hormon dependentă, aceasta câștigă capacitate de răspuns la hormon; legarea receptorului la *enhancer*-ul *HRE*, este mediată de o regiune *Zn-finger*

Elementul central al receptorilor nucleari este reprezentat de superfamilia **receptorilor *steroid-tiroid-retinoid***, care a fost divizată pe criterii structurale în familii pentru steroid, hormoni tiroidieni, hormoni derivați din vitaminele A și D și unii acizi grași. Familia receptorilor denumiți metaforic „***orfani***“ cuprinde receptori nucleari, pentru care nu s-au identificat încă liganzii corespunzători.

2.2.2. *FACTORII TRANSCRIPȚIONALI GATA*

Fatorii transcripționali *GATA* reprezintă o variantă a clasei de factori transcripționali C_4, ce conțin motive cu Zn. Domeniul *GATA* interacționează cu o secvență ADN bogată în Guanozină-Adenozină-Timină-Adenozină, de la care provine acronimul clasei. Din această familie fac parte factorii *GATA-1, GATA-2, GATA-3* și *GATA-4*. Motivul *GATA* a fost identificat inițial în regiunea reglatoare cis a genelor specifice eritrocitelor (ex. gena globinei)

Factorii transcripționali *GATA* au fost descoperiți la fungi, metazoare și plante, într-un număr mai redus decât modelele clasice *Zn finger*. La proteinele cu motive *GATA* sunt conservate motivele structurale și specificitatea lor de legare dar nu și restul proteinei.

La vertebrate factorii transcripționali *GATA* prezintă două domenii separate de câțiva aminoacizi. Domeniul -COOH terminal este domeniul de legare la ADN, iar domeniul -NH_2 terminal, modulează legarea specifică de ADN și interacția cu alte proteine. Domeniul *GATA* este alcătuit din două motive *Zn finger* de aproximativ 50 aminoacizi și un domeniu terminal bazic. Domeniul de legare la ADN recunoaște șase perechi de baze azotate. La metazoare domeniile *Zn finger GATA* au întotdeauna bucla formată din 17 aminoacizi cu o Leucină în poziția 7 a buclei, sau, mai rar, o Alanină la unele motive de la nematodul *Caenorhabditis elegans*. La nevertebrate au fost descoperiți factori cu unul sau două domenii. La plante, bucla are 18 aminoacizi, cu o Lizină suplimentară în poziția 16, iar in poziția șapte a buclei prezintă o Leucină sau o Glutamină. Proteinele fungale cu domenii *GATA* pot fi grupate în două tipuri: unul asemănător cu motivul de la animale, iar celălalt cu cel de la plante. Aproape fără excepție, factorii fungali *GATA* conțin un singur domeniu de legare la ADN. Și la *Saccharomyces cerevisiae* s-au găsit proteine cu domenii de legare *GATA*. Unele sunt similare domeniilor *„animal-like"*, sau *„plant-like"*, de la fungi, iar altele sunt cert factori transcripționali *GATA*, chiar dacă nu mai păstrează secvența conservată. Este posibil ca domeniile *GATA* să fi apărut la eucariotele primitive, deoarece un motiv înrudit cu factorii *GATA* a fost întâlnit în produsul genei *stalky* la ciuperca inferioară *Dictyostelium discoideum*. Nu se știe dacă factorii transcripționali *GATA* sunt prezenți și la alte eucariote primitive.

Rolurile factorilor transcripționali cu domenii *GATA* sunt variate. La vertebrate, aceștia participă în diferențierea celulară terminală, împreună cu alți factori transcripționali. La mamifere au fost identificați șase factori *GATA*. Primul descoperit, și cel mai bine caracterizat, este ***GATA-1***, care are rol esențial în diferențierea liniilor celulare roșii și megaloblasice. Ceilalți participă la diferențierea limfocitelor T, endoteliului, intestinelor și în diferențierea inimii. La *C. elegans* factorii transcripționali ***End-1*** și ***Elt-1*** sunt implicați în diferențierea endodermului. La *Drosophila*, factorii *GATA* reglează răspunsul imun, pattern-ul perișorilor și sinteza proteinelor din ou. Funcționarea factorilor transcripționali *GATA* la plante este puțin cunoscută. Se știe că promotorii inductibili la lumină conțin cutii *GATA* funcționale, dar nu a fost demonstrată implicarea nici unui factor *GATA* specific. La fungi, aceștia intervin în metabolizarea azotului.

2.3. CLASA C_6

Această clasă reprezintă o variantă a motivelor cu Zn, întâlnită la activatorii transcripționali de la drojdii, de exemplu ***GAL4***. Motivul este format din șase Cisteine și doi ioni de Zn^{++}. Cei doi ioni de Zn formează un cluster binucleat, în care fiecare ion de Zn contactează patru Cisteine; două din cele șase Cisteine fiind legate de ambii ioni de Zn. Ionii de Zn se găsesc la o distanță de aproximativ 3,5 Å. *GAL4* se leagă de ADN ca dimer, la un situs format din 17 perechi de baze azotate. Domeniul de legare la ADN se află la capătul $-NH_2$ terminal: resturile 1-74 sunt suficiente pentru recunoaștere. Dimerizările creează contacte adiționale care cresc afinitatea specifică de legare.

3. SUPERCLASA FACTORILOR TRANSCRIPȚIONALI CU DOMENII BAZICE

Factorii transcripționali din această superclasă conțin o regiune bazică pentru interacția cu ADN, urmată de motive *leucin zipper*, *helix-loop-helix* sau ambele.

3.1. CLASA FACTORILOR TRANSCRIPȚIONALI *BAZICI LEUCIN ZIPPER (FERMOAR CU LEUCINĂ)*

Această clasă de factori transcripționali cuprinde mai multe familii. Cele mai cunoscute sunt familiile: *AP1, CREB,* factorii *C/ERB-like* și factorii specifici plantelor care se leagă de cutia G. Motivul acestei clase a fost identificat ca un fragment α helical de 30 aminoacizi. Capătul -COOH terminal al monomerilor are rol în stabilirea de interacții hidrofobice, importante în dimerizare. O leucină a fost găsită aproape exclusiv în poziția 7 a celor patru-cinci heptade succesive, în *GCN4, Fos, Jun* și în alți membri ai acestei clase.

Acest motiv are o structură repetitivă, alcătuită din șapte aminoacizi. Aminoacizii din pozițiile 1 și 4 sunt predominant apolari și sunt localizați la suprafața α helixului. Ei au rol în formarea unei structuri „*coiled-coil*“ împreună cu domeniul de dimerizare al altei proteine *Leucin zipper*. De obicei, o structură tipică „*coiled-coil*“ a unui α helix este alcătuită din aproximativ 100 aminoacizi, astfel încât α helixurile din *Leucin zipper* se înfășoară unul în jurul celuilalt, pe aproximativ un sfert de tur.

Nu toți dimerii cu structură „*coiled-coil*“ sunt stabili. Regiunile *zipper* ale unor proteine *basic/coiled-coil* (bCC) nu formează homodimeri stabili, fiind necesar un alt partener (ex proteina *Jun* pentru *Fos*) pentru dimerizare și legare la ADN. Prin heterodimerizare se diversifică proprietățile

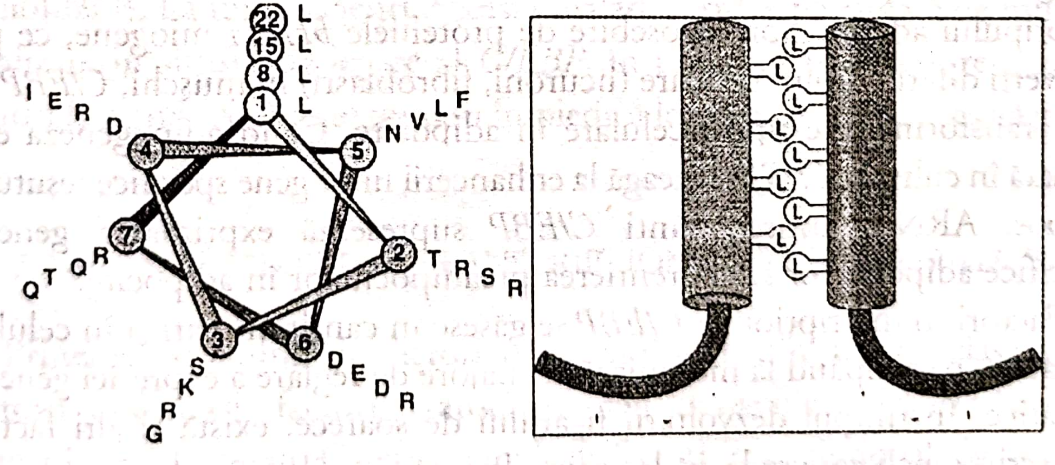


Fig. 8— Poziția Leucinei în α helixul de dimerizare (stânga) și dimerizarea unor proteine *bazice/Leucin Zipper* (dreapta). Regiunile bazice ale proteinei sunt marcate cu „+“ iar leucinele sunt marcate cu „L.“

funcționale ale acestor factori prin creșterea numărului de circuite celulare cu rol reglator, care se pot realiza.

Extremitatea -NH_2 terminală, prin porțiunea bazică , are rol în legarea la ADN. Domeniul bazic este alcătuit din 25–30 aminoacizi. În absența ADN, regiunea bazică apare relativ nestructurată, deși la temperaturi joase au fost detectate unele structuri α helicale. Prin legare la ADN, ea devine aproape în întregime α helicală. Regiunile bazice α helicale se îndepărtează de segmentul α helical *„coiled-coil“*, pentru a optimiza legarea regiunilor bazice de adâncitura majoră a ADN. Secvențele consens, recunoscute de aceste proteine, au 9–10 perechi de baze. Astfel, complexul *API* (proteina activatoare 1), format din homodimerii *Jun* sau heterodimerii *Fos/Jun*, se leagă de secvența palindromică TG(C/G)TCA.

Unele proteine *bCC*, ca de exemplu *GCN4*, de la drojdie, se leagă cu o afinitate aproape egală la situsurile *API* și *CREB-ATF*. Factorul transcripțional fungal *GCN4* aparține familiei *AP1*, subfamilia factorilor de tip *AP1*.

S-a constatat că mai multe proteine bZip pot recunoaște aceiași secvență. Astfel, secvența CCAAT este recunoscută de mai multe proteine. Dintre acestea, cea mai cunoscută este ***C/EBP*** (*CCAAT* ***enhancer-binding protein***). Factorul transcripțional a fost purificat inițial din nucleii hepatocitelor de șoarece, fiind implicat în diferențierea terminală. Rolul acestui factor, în adipogeneză, este similar proteinelor miogene *bHLH*, în miogeneză. Exprimarea precoce a *C/EBP* în preadipocite induce exprimarea fenotipului adipos. Spre deosebire de proteinele *bHLH* miogene, ce pot converti diferite tipuri celulare (neuroni, fibroblaști) în mușchi, *C/EBP* nu pot transforma alte tipuri celulare în adipocite. Când adipogeneza este inițiată în cultură, *C/EBP* se leagă la enhancerii unor gene specifice țesutului adipos. ARNm antisens anti *C/EBP* supresează exprimarea genelor specifice adipocitelor și diferențierea preadipocitelor în adipocite.

Factorii transcripționali *C/EBP* se găsesc în cantități mari și în celulele hepatice, participând la mecanismele majore de reglare a expresiei genelor hepatice. În timpul dezvoltării ficatului de șoarece, există și alți factori transcripționali care se leagă la regiunile promotorilor și enhancerilor din genele specifice hepatice. Totuși, funcția acestor gene este dependentă de exprimarea *C/EBP*. Una din genele hepatice, activată de proteina *C/EBP* este și gena pentru factorul IX de coagulare. Mutații în această genă cauzează

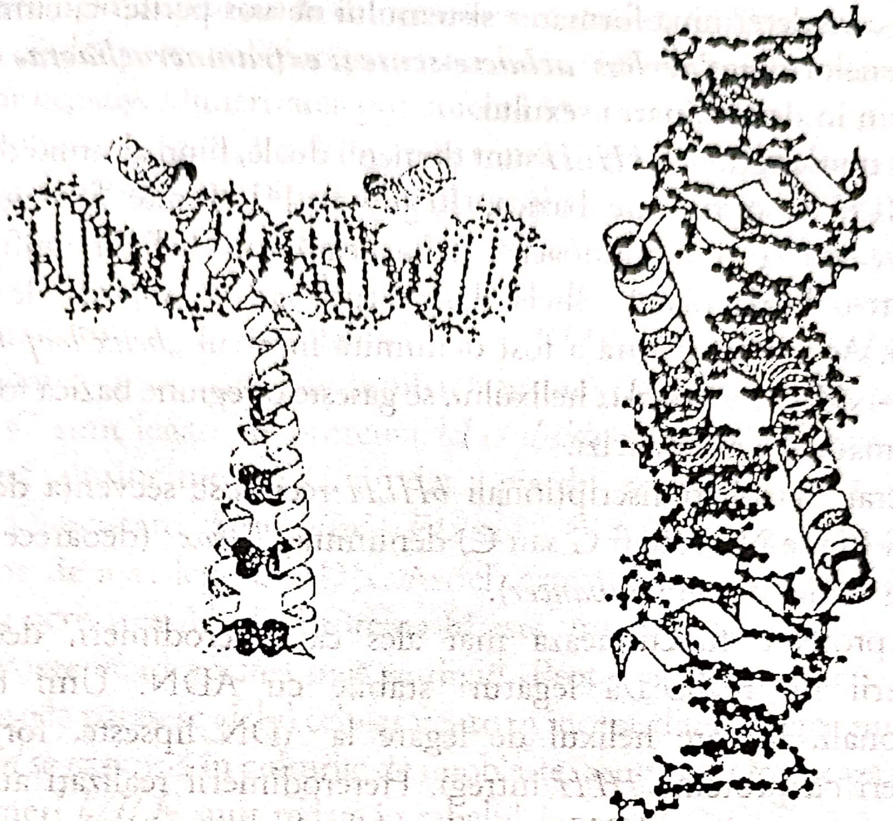


Fig. 9 — Proteina *C/EBP*. Reprezentarea interacției dintre regiunea de legare la ADN și o regiune din ADN ce conțin secvența CCAAT (stânga). Vedere dorsală a aceluiași complex. Leucinele leagă cele două subunități ale complexului proteinic.

hemofilia B. La unii pacienți, această maladie este determinată de mutații localizate în situsul de legare al *C/EBP*, în regiunea promotoare a genei pentru factorul IX. Aceste mutații împiedică legarea *C/EBP* la această genă.

3.2. CLASA FACTORILOR TRANSCRIPȚIONALI *BAZICI-HLH (bHLH)*

Principalele familii de factori transcripționali din această clasă sunt: factorii ubicvitari, factorii transcripționali miogenici, *Achaete-Scute* și domeniul *HLH* singur. Câteva exemple de factori transcripționali din această clasă sunt: factorii ***E12, E47*** (factori ubicvitari), ***MyoD, miogenin, Mif5*** (factori transcripționali miogenici), *MASH-1* și *MASH2 (familia Achaete-Scute*). La *Drosophila* au fost identificate structuri *bHLH* în proteinele care determină formarea sistemului nervos periferic, cum sunt produșii genelor ***daughterless, achaete-scute și extramacrochaetae*** și cele care intervin în determinarea sexului.

Factorii transcripționali *bHLH* sunt domenii duale, fiind alcătuiți dintr-o regiune HLH și o regiune bazică. Regiunea HLH este formată din aproximativ 50 resturi de aminoacizi, ce formează două helixuri amfipatice unite printr-o buclă (*loop*). Bucla de legătură are o lungime de 9–20 aminoacizi. Această structură a fost denumită motivul „*helix-loop-helix*". La capătul -NH_2 terminal al α helixului, se găsește o regiune bazică formată din aproximativ 15 aminoacizi.

În general factorii transcripționali *bHLH* recunosc secvența de baze CANNTG (unde N poate fi G sau C) denumită „*E-box*" (deoarece a fost descoperită inițial într-un *enhancer*).

Aceste proteine funcționează mai ales ca heterodimeri, deoarece homodimerii nu realizează legături stabile cu ADN. Unii factori transcripționali, la care helixul de legare la ADN lipsește, formează heterodimeri cu proteine *HLH* întregi. Heterodimerii realizați au doar jumătate din contactele cu ADN și sunt instabile. Acest mecanism determină inactivarea unor factori transcripționali. Helixul de dimerizare conține aminoacizi hidrofobi, la fiecare a 3 a sau a 4 a poziție, astfel că el prezintă o suprafață hidrofobă, spre exterior. Această suprafață permite proteinei să se împerecheze prin interacții hidrofobe cu proteine identice sau înrudite

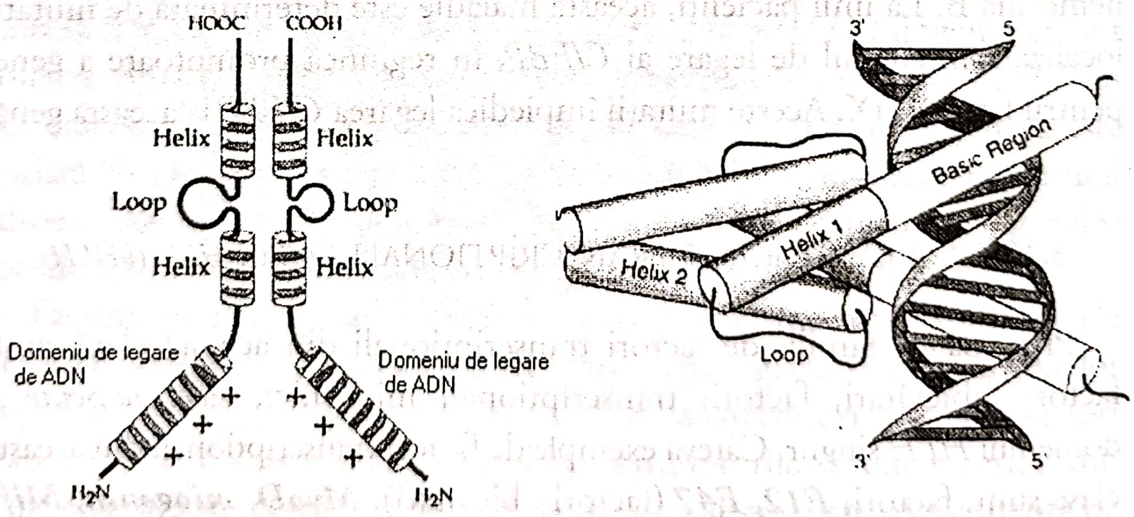


Fig. 10 — Structura unui dimer *bHLH* (stânga) și modul de legare la ADN (dreapta).

care prezintă o suprafață de dimerizare asemănătoare. Dimerizarea se poate realiza cu doi potențiali parteneri: unul este reglator pozitiv, iar celălalt este reglator negativ. Dimerizarea proteinei ubicvitare cu reglatorul pozitiv, duce la formarea unui complex de activare transcripțională a genelor recunoscute. Legarea proteinei ubicvitare de reglatorul negativ are ca rezultat formarea unui complex, de data aceasta inactiv, care represează transcripția acelorași gene. De exemplu, familia de proteine ***MyoD*** are rol în inițierea miogenezei, când se complexează cu proteina *E12* sau *E47* (2 proteine *bHLH* ubicvitare). Dezvoltarea musculară este inhibată, atunci când proteinele *MyoD, E12* sau *E 47* sunt legate de proteina ***Id*** *(Inhibitor of differentiation)*. Această proteină conține motive *HLH*, dar a pierdut regiunea bazică de legare la ADN. Dimerizarea *Id* cu *MyoD, E12* sau *E47* interferă cu capacitatea acestei proteine de a se lega la ADN. Astfel, exprimarea proteinei *Id* în celule, previne activarea *MyoD*. Proteina Id este sintetizată în celulele musculare precursoare când acestea încă se divid. Proteina dispare din celulă, când mioblastele părăsesc ciclul celular pentru a începe diferențierea miotubulilor. Dacă *Id* se exprimă în culturile de mioblaste, acestea nu formează miotubuli.

Dimeri *bHLH* sunt redați în tabelul 1

Dimer	Neurogeneza la *Drosophila*	Miogeneza la mamifere	Diviziunea celulară la mamifere
Proteină ubiquitară	*Daughterless*	*E12, E47*	*Max*
Reglator pozitiv	*achaete-scute*	*Familia MyoD*	*mye*
Reglator negativ.	*extramacrochaetae*	*Id*	*Mad sau Max*

3.3. CLASA FACTORILOR TRANSCRIPTIONALI *BAZICI-HLH-LEUCIN ZIPPER (b/HLH/Z)*

Din această clasă de factori transcripționali fac parte familia factorilor *b/HLH/Zip* și familia factorilor de control ai ciclului celular. Factorii transcripționali din această clasă au următoarea structură: o regiune bazică pentru legare de adâncitura majoră a ADN, un motiv *HLH* și unul *leucin zipper* (cu o heptavă conservată) pentru dimerizare. Motivul *HLH* este alcătuit din 2 helixuri pentru fiecare monomer. Putem considera regiunea bazică o extensie a helixului -NH_2 terminal din motivul HLH, regiunea zipper o prelungire a capătului -COOH terminal din motivul HLH, astfel încât monomerii *b/HLH/Z* apar alcătuiți numai din patru α helixuri.

Max și ***USF*** (*upstream stimulatory factor*) sunt proteine *b/HLH/Zipper*. *Max* aparține subfamiliei *Mad/Max* (familia factorilor *b/HLH/Zip*), iar *USF* aparține subfamiliei *USF* (familia factorilor de control ai ciclului celular)

Max a fost cristalizat împreună cu o secvență de 22 pb pentru a fi caracterizat prin RMN (rezonanță magnetică nucleară). La acesta s-au evidențiat două α helixuri lungi, separate de o buclă. Helixul de la capătul $-NH_2$ terminal este continuu și conține regiunea bazică și H1. Al doilea α helix conține regiunile H2 și *leucin zipper*. Secvențele conservate din HLH și *leucin zipper* au rol în dimerizarea acestor proteine. Fiecare regiune bazică conservată recunoaște o jumătate de situs de legare cu secvența consens CANNTG (N reprezintă orice nucleotid)

Max se leagă de ADN ca homodimer, cu monomerii pliați într-un mănunchi alcătuit din cele patru helixuri rotite spre stânga. Cele două regiuni bazice sunt îndreptate de la mănunchiul de helixuri spre ADN și intră în adâncitura majoră din direcții opuse. Două segmente α helicale formează o structură *coiled-coil*, răsucită spre stânga.

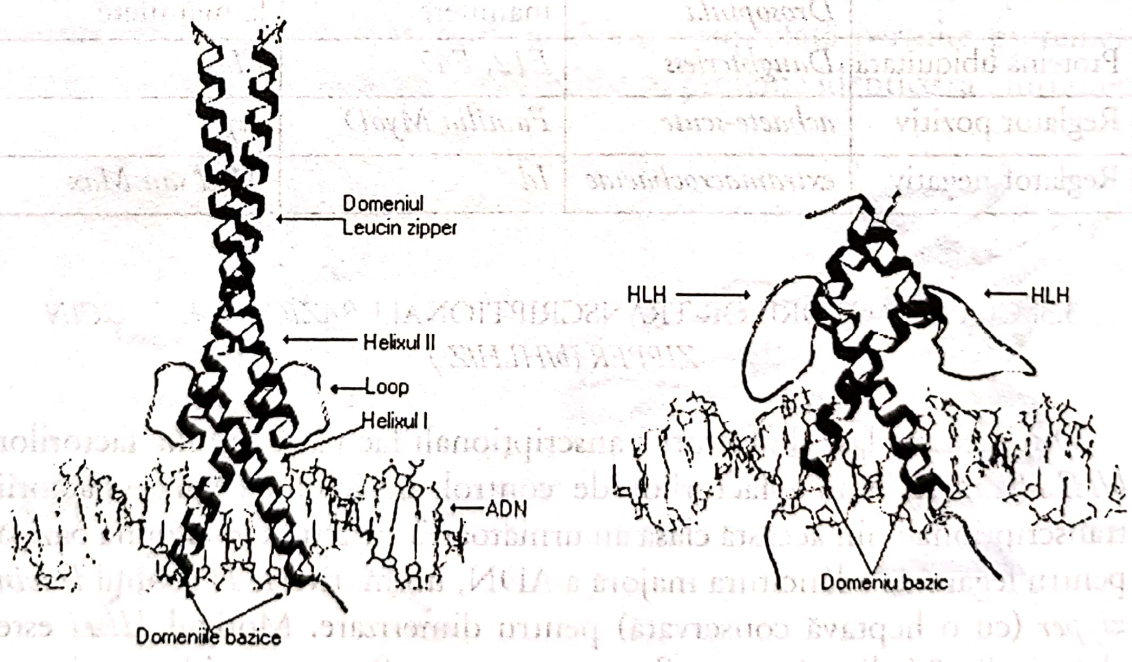


Fig. 11 — *MAX (b/HLH/Zipper)* stânga și regiunea *b/HLH a USF (b/HLH/Zipper)* dreapta

USF a fost purificat din nucleii izolați din linia celulară HeLa, sub forma a două polipeptide de 43kDa (*USF1*) și 44kDa (*USF2*). Fiecare dintre aceste polipeptide prezintă situsuri specifice de legare la ADN. Deși expresia *USF1* și *USF2* este ubicvitară, în diferite celule, proporția homo și heterodimerilor *USF* este diferită. Această observație, împreună cu descoperirea cooperării dintre *USF* și *TFII*, indică posibilitatea implicării mai generale a *USF* în reglarea transcripției.

La *USF* s-a constatat că deși sunt pierdute regiunile zipper, contactele cu ADN sunt aproape identice cu cele ale complexului Max-ADN. În ambele cazuri, ADN cuplat cu proteine este în forma B și neîndoit.

Structura *USF* care are deletat fragmentul zipper diferă de proteinele întregi prin unghiul de încrucișare al helixurilor motivului *HLH* și prin conformația buclei (loop). Ferre-Dammare și Burley sugerează că rolul

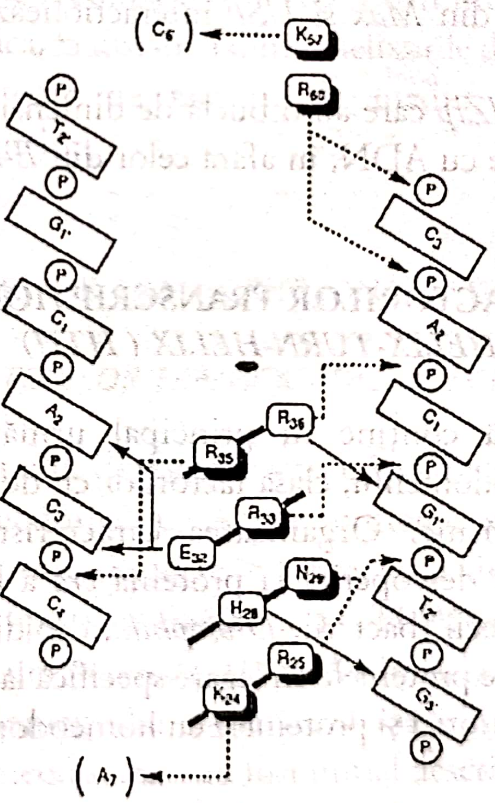


Fig. 12 — Schema contactelor dintre *MAX* și ADN. Săgețile continue indică contactele dintre aminoacizi și nucleotide. Aminoacizii care realizează contacte cu grupele fosfat sunt prezentate umbrit. Contactele realizate în afara graniței sunt prezentate în paranteză.

regiunii *zipper* este de a stabiliza regiunile *HLH* mai puțin optim împerecheate.

Experimentele biochimice au arătat că *USF* este capabil să realizeze homomeri bivalenți, care se pot lega simultan la două situsuri țintă. Această observație sugerează că regiunea *zipper* la proteinele bazice *HLH-zipper* are capacitatea de a media buclarea dublului helix ADN.

Homodimerii *Max, USF* și, prin analogie, homodimerii și heterodimerii de *HLH*, precum și de alte proteine *b/HLH/Z*, au un domeniu globular, format din gruparea celor patru helixuri. Această structură este menținută prin legături van der Waals, ce apar în miezul hidrofobic conservat.

La proteinele *HLH* și *b/HLH/Z*, bucla de legătură a helixurilor diferă ca secvență a aminoacizilor și lungime. La *Max* și *USF* distanța dintre ultimul aminoacid al primului helix și primul aminoacid al celui de al doilea helix este de aproximativ 15Å. Această distanță face ca bucla de legătură să fie formată din minim 4–5 aminoacizi.

Bucla de legătură din *Max* și *USF* interacționează și ea cu scheletul fosfodiesteric.

Proteinele *b/HLH/Zip* care au o buclă de dimensiuni mari pot realiza contacte suplimentare cu ADN, în afara celor din *E-box*.

4. SUPERCLASA FACTORILOR TRANSCRIPȚIONALI CU MOTIV *HELIX-TURN-HELIX (HTH)*

Această superclasă conține în principal următoarele clase: clasa proteinelor cu homeodomeniu, clasa factorilor cu domeniu *POU* și clasa factorilor de șoc termic. Organizarea caracteristică acestor factori transcripționali a fost descoperită la proteina *cro* a bacteriofagului λ și, ulterior, la diferite specii (bacterii, *Drosophila*, drojdii). Acest motiv este foarte răspândit printre proteinele cu legare specifică la ADN. Mulți factori transcripționali procariotici și proteinele cu homeodomenii de la eucariote conțin acest motiv.

HTH este definit ca un segment de 20 aminoacizi, ce formează două α helixuri, care se încrucișează după un unghi de 120°.

Al doilea helix al *HTH* a fost denumit helix de recunoaștere, pentru că se plasează în adâncitura majoră. Expunerea acestui helix perechilor de baze depinde și de restul structurii domeniului. În unele cazuri (ex. represorul λ și brațul -NH_2 terminal de la proteinele cu homeodomenii), elementele adiționale realizează contacte suplimentare cu perechile de baze. Conformația ADN din situsul de legare e stabilizată prin legarea proteinei.

Proteina *cro* (66 aminoacizi) reglează expresia genelor bacteriofagului λ. Situsul de legare la ADN al monomerilor proteinei *cro* este alcătuit din 20 de aminoacizi, aranjați în două α helixuri unite printr-un scurt segment (*turn*). Un α helix din fiecare monomer se plasează în adâncitura majoră a helixului ADN; aminoacizii dinspre exteriorul helixului realizează legături de hidrogen cu perechile specifice de baze. O caracteristică a acestui motiv este că cele două helixuri de recunoaștere ale dimerului sunt separate de exact un tur de helix ADN (3,14 nm). Această separare permite fiecărui helix de recunoaștere să realizeze legături într-o manieră identică cu secvențe repetate din situsul de recunoaștere al ADN. Afinitatea pentru ADN este influențată de modificarea distanței dintre helixurile de recunoaștere. Aceste modificări, determinate de factorii de mediu, schimbă activitatea transcripțională a genelor.

4.1. CLASA FACTORILOR TRANSCRIPȚIONALI CU HOMEODOMENIU

4.1.1. FAMILIA FACTORILOR TRANSCRIPȚIONALI CU HOMEODOMENIU

O familie importantă de factori transcripționali este reprezentată de proteinele cu homeodomeniu. Aceste proteine sunt esențiale pentru specificarea axei antero-posterioare în tot regnul animal. Homeodomeniul este alcătuit din 60 aminoacizi aranjați în HTH. Al treilea helix al motivului se extinde în adâncitura majoră a ADN. Aminoacizii din porțiunea -NH_2 terminală a homeodomeniului contactează adâncitura minoră.

Proteinele cu homeodomenii au fost inițial descrise la *Drosophila*, unde în stare mutantă determină transformarea unui segment al corpului în altul, fenomen denumit *homeosis*.

Multe proteine cu homeodomenii au fost secvențiate, clonate și testate pentru a li se studia situsul de ADN recunoscut și capacitatea de reglare a transcripției. În tabelul 2 sunt redate nouă proteine cu homeodomenii de la *Drosophila* și secvențele de ADN recunoscute.

Tabelul 2. Nouă proteine cu homeodomenii la *Drosophila melanogster*.

Proteina	Situsul de legare din ADN
Abdominal B	TAATTTGCAT TCAATTAAAT
Antenapedia	TAATAATAATAATAA
Bicoid	TCCTAATCCC
Engrailed	TCAATTAAAT
Even-skipped	TCAATTAAAT TAATAATAATAATAA TCAGCACCG
Fushi tarazu	TCAATTAAAT TAATAATAATAATAA
Paired	TCAATTAAAT
Ultrabithorax	TAATAATAATAATAA
Zerknult	TCAATTAAAT

Funcționarea proteinelor cu homeodomenii este esențială dezvoltării drosofilei. Astfel, proteina *Bicoid* este un factor transcripțional cu homedomeniu ce se leagă de promotorul genei *Hunchback*, activându-i transcripția. Proteina *Hunchback* rezultată este tot un factor transcripțional ce se leagă de enhancerii genelor necesare formării capului și toracelui insectei.

Schimbări mici în compoziția de aminoacizi a situsului de legare la ADN determină apariția unor fenotipuri caracteristice.

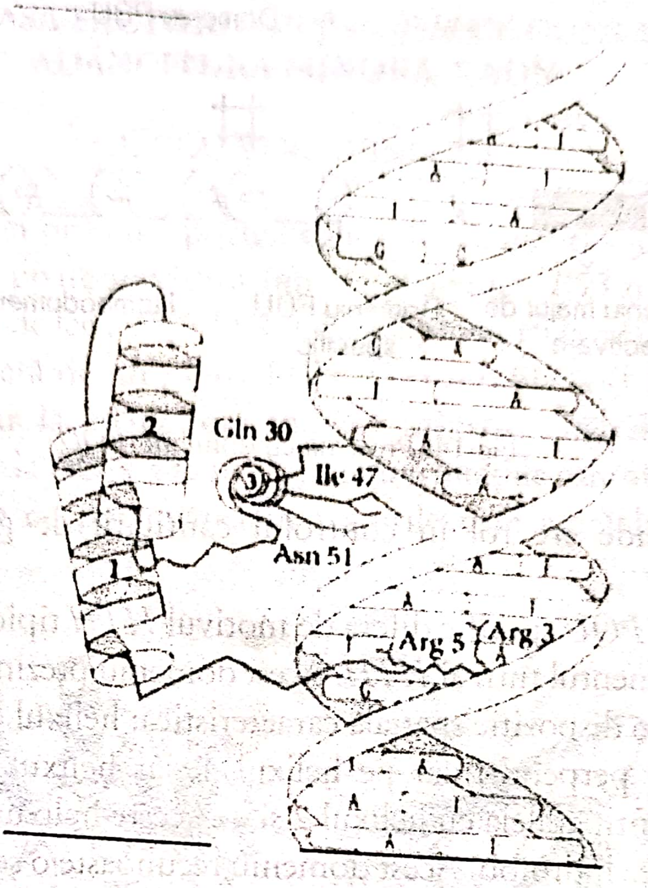


Fig. 13— Homeodomeniul proteinei *Engrailed*, legat la un situs particular din ADN. Helixul 3 contactează perechile de baze din adâncitura majoră, în timp ce porțiunea $-NH_2$ terminală a homeodomeniului intră în adâncitura minoră.

4.1.2. FAMILIA FACTORILOR TRANSCRIPȚIONALI CU DOMENIU POU

Domeniul *POU* este un *HTH* de graniță, fiind alcătuit din două domenii independente de legare la ADN: un domeniu *POU* specific și un homeodomeniu *POU*. Ambele domenii folosesc motivul *HTH* pentru a contacta situsurile de legare din adâncitura majoră a ADN. Inițialele acestui domeniu provin de la primele patru proteine descoperite cu aceste motive: ***Pit1***, un factor specific hipofizei care activează genele pentru hormonii de creștere și prolactină și unele proteine hipofizare; *Oct1* este o proteină ubicvitară pentru o anumită secvență de opt perechi de baze, denumită *octa-box* și *Oct2*, o proteină specifică celulelor B, care recunoaște tot un *octa-box* și activează genele pentru imunoglobuline și *UNC-86* întâlnită la

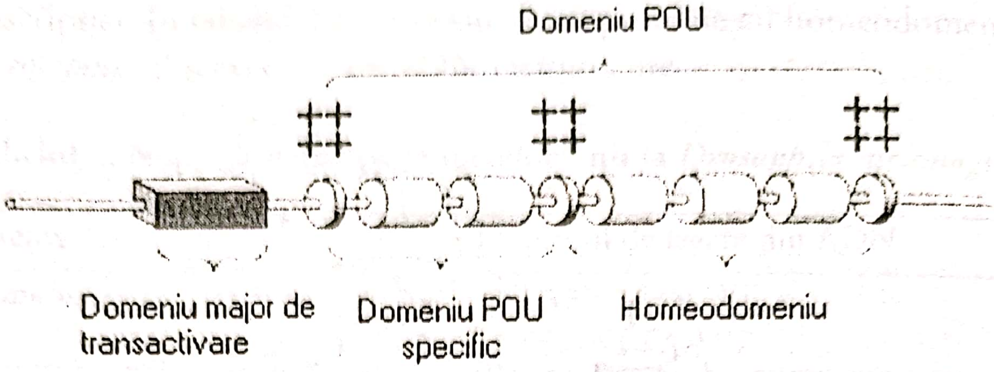


Fig 14. Proteină cu domeniu *POU*

nematode, unde are rol în controlul cantității de grăsimi în celulele neuronale.

Domeniul *POU* specific diferă de motivul *HTH* tipic prin 6 aminoacizi inserați în segmentul turn al *HTH*. Acest domeniu prezintă patru α helixuri. Helixurile au o dispoziție spațială caracteristică: helixul 1 și 4 sunt paralele, helixul 2 este perpendicular pe helixul 4, iar helixul 3 are o dispoziție aproximativ antiparalelă cu helixul 2 și 4. Aceste helixuri participă la realizarea unui miez hidrofob. Acest domeniu recunoaște o secvență octamerică.

Homeodomeniul *POU* are structură și mod de legare similar cu homeodomeniul altor proteine. Homeodomeniul *Pit-1* recunoaște secvența ATATTCAT, în timp ce homeodomeniul *Oct2* recunoaște secvența similară AT**TTG**CAT. Dacă elementul recunoscut de *Pit-1* este substituit în două puncte, astfel încât să devină un situs pentru legarea *Oct2*, prolactina va începe să fie sintetizată în limfocite.

Brațul -NH_2 terminal realizează contacte suplimentare cu baze din adâncitura minoră a ADN. Domeniul *POU* specific este unit de homeodomeniu printr-un linker, care se presupune că are o structură flexibilă, deoarece la analizele cristalografice această regiune este complet dezordonată. Între cele două domenii au fost găsite și alte contacte diferite de cele covalente ale likerului și cele de tip proteină-proteină. Factorii transcripționali cu domenii *POU* pot realiza legături și cu alte proteine.

5. SUPERCLASA FACTORILOR *β scaffold* CE CONTACTEAZĂ ADÂNCITURA MINORĂ A ADN

5.1. CLASA PROTEINEI *P53*

Structura acestei proteine poate explica de ce uneori substituirea unui singur aminoacid poate modifica funcția proteinei. *P53* nu conține nici un motiv standard de legare la ADN. Legarea proteinei la adâncitura majoră a ADN este mediată de un motiv helix (H2) și o buclă (L1) a motivului *loop-sheet-helix,* iar la adâncitura minoră printr-o Arg, din altă buclă. Suprafață de legare la ADN este neobișnuită. Mutațiile care afectează această suprafață sau cele ce pot apărea în resturile care ajută la poziționarea proteinei, la stabilizarea suprafeței de legare la ADN sau în buclele ce contactează ADN, modifică contactele realizate cu ADN. Astfel, substituția unui singur aminoacid poate afecta funcționarea proteinei.

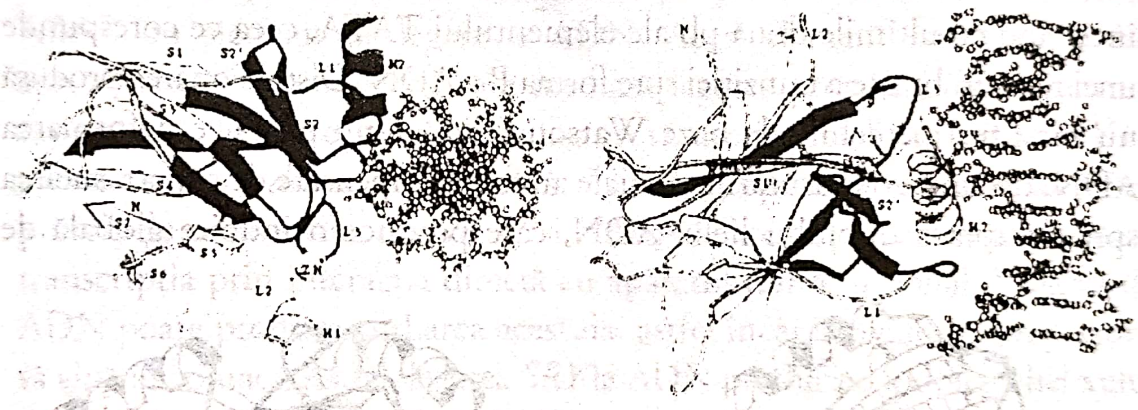


Fig. 15 — Proteina P 53. Stânga: schița complexului ADN-miez proteinic. Axul ADN este perpendicular pe planul figurii. Elemente structurale H (α helix), S (α pliat), L (bucle). Dreapta: schița complexului rotită cu 90^0 în jurul axei orizontale, axa ADN este axa verticală.

5.2. CLASA *TATA BINDING PROTEINS (TBP)*

TBP recunoaște adâncitura minoră a ADN. Structura *TBP* a fost analizată la *Arabidopsis*. *TBP* are o secvență conservată filogenetic, regiunea -COOH terminală (de 180 aminoacizi), două secvențe repetate, o porțiune amino terminală (cu lungime variabilă).

Structura tridimensională a *TBP* are formă de șea. Alfa helixul formează o suprafață de legare pentru elementele mașinăriei de transcripție. Partea concavă, antiparalelă, β-pliată a *TBP* încalecă dublul helix ADN. Cele opt catene antiparalele β-pliate furnizează o suprafață concavă largă pentru adâncitura minoră a ADN. Capătul 5' al formei B a ADN intră sub șeaua moleculară, unde o tranziție abruptă către o formă parțial nerăsucită spre dreapta a dublului helix este indusă de către inserția a două resturi de Fenilalanină, în primul pas de baze T:A. Fața nerăsucită și ușor îndoită a adânciturii minore a ADN permite interacțiile directe dintre lanțurile de proteine și marginile celor 6 pb centrale ale adânciturii minore. Un nod secundar mare este indus de către 2 resturi de fenilalanină, în pasul de baze, începând cu ultimile două pb ale elementului TATA, ceea ce corespunde unei reveniri bruște a tranziției spre forma B a ADN. Distorsionarea produsă nu modifică perechile de baze Watson-Crick și nu produce deformarea ADN, deoarece desfășurările parțiale au fost compensate de superrăsucirea spre dreapta a dublului helix ADN, care produce o îndoire globală de

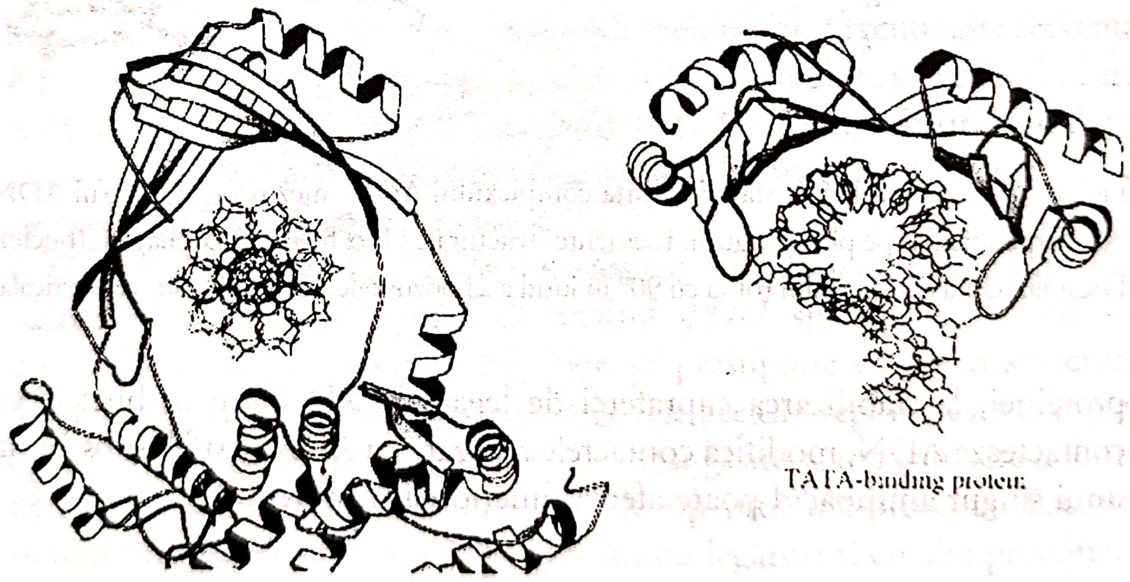


Fig 16. *TBP2* de la *Arabidopsis thaliana* complexată cu elementul *TATA* al promotorului târziu de la *Adenovirus*. ADN este figurat ca o baghetă. Când *TBP* se leagă de adâncitura minoră a elementului *TATA*, ADN este nerăsucit și îndoit pentru a prezenta marginile bazelor din adâncitura minoră, feței inferioare (concave) a șeii moleculare

aproximativ 100°. Contactul cu bazele de pe o parte a catenei, este limitat la adâncitura minoră, incluzâd cele 4 fenilalanine descrise mai sus, patru legături de hidrogen și un număr mare de legături van der Waals. Apa nu participă la realizarea acestor interacții. Îndoirea produsă promotorului de *TBP* are rol în transcripție, prin aducerea factorilor legați la promotor mai aproape de complexul de preinițiere. Modelul de legare și deformarea ADN pare să fie asemănător la toate *TBP*.

6. ALȚI FACTORI TRANSCRIPȚIONALI CLASA *HMG1*

Această clasă de factori transcripționali funcționează în principal ca proteine de legare la ADN. Caracteristic pentru aceste proteine este cutia *HMG*, un element de legare la ADN. Acest element este format din aproximativ 80 aminoacizi care mediază legarea proteinei de adâncitura minoră a ADN. Această clasă de factori transcripționali cuprinde *SRY* (*Y chromosome sex-determining factor*), *LEF-1* (*lymphocyte enhancer protein*), proteinele cromatiniene *HMG-1* și *HMG-2*. Aceste proteine nu activează transcripția prin interacția directă cu aparatul transcripțional. Legarea de ADN poate produce curbarea acestuia, astfel încât activatorii și represorii să vină în contact. Astfel, legarea *SRY* la ADN produce o îndoire a helixului de 70–80°, având forma literei „*L*“.

Proteina *SRY* se leaga la ADN, astfel încât factorii care sunt dispuși la distanță pe cromozom să poată veni în contact.

Proteinele ce îndoaie ADN pot crea structuri tridimensionale specifice denumite *enhanceosomi* (particule amplificatoare) (Thomas și Maniatis, 1995). S-a aratat ca interacția directă proteină–proteină este facilitată de prezența *HMG-1*. Enhancerul genei interferonului-b de la om are trei situsuri pentru aceasta proteină. Acestea sunt esențiale pentru activarea sinergică a complexului de factorii transcripționali. Prezența doar a factorilor transcripționali la nivelul promotorului *INFb* nu este suficientă, pentru inițierea transcripției. Factorii transcripționali trebuie să fie aranjați corespunzator, la nivelul enhancerului. Prin asocierea acestor factori în jurul elementelor de legare din ADN, se pot forma diferite combinații, dar numai combinația corespunzătoare este funcțională. Aranjamentul spațial, helical,

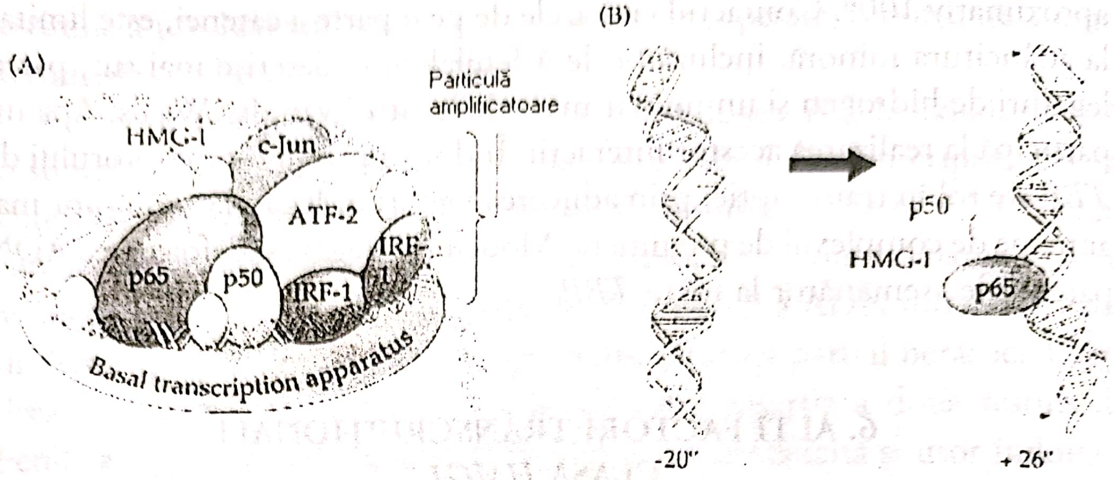

(A)
HMG-I
c-Jun
ATF-2
p65
p50
IRF-1
IRF-1
Basal transcription apparatus
Particulă amplificatoare
(B)
-20"
p50
HMG-I
p65
+ 26"

Fig. 17— Structura unui enhanceosom (particulă amplificatoare). (A) Proteina *HMG-1* înfășoară 60 perechi de baze în jurul activatorilor transcripționali *NF-kB, IRF1* și *ATF2/c-Jun. HMG-1* este plasat în adâcitura minoră a ADN, ceilalți factori acționează în adâncitura majoră. După ce s-a format enhanceosomul, curbarea ADN devine +26°.

al acestor factori este de asemenea important. Proteina *HMG-1* se prinde cu ceilalți factori la nivelul enhanceosomului. Dacă înainte de formarea enhanceosomului ADN are o îndoire naturală de -20°, după formarea acestuia, îndoirea ADN devine de +26°.

Și alte proteine au situsuri specifice de legare la ADN: endonucleazele de restricție de clasă II, enzimele ce produc schimbări conformaționale majore în ADN (ex: metiltransferazele, topoizomeraza1 etc.).

Asocierea mutațiilor factorilor transcripționali cu patologia umană.

Gena	**Localizare cromozomală**	**Sindromul**	**Tipul mutației**	**Model omolog la șoarece**	**Tip de ereditate**	**Domeniul de legare la ADN afectat**
PIT1	3p11	Cretinism combinat cu deficiență hormonală	M, N, (dominantă)	Dwarf	R	POU
POU 3F4	Xq21	Surditate X-linkată	M,ID,CR, P		X	POU
PAX2	10q25	Coloboma nervului optic și hipoplazia renală	ID	K.O.	D	Domeniu de împerechere.
PAX6	11p13	Aniridia Anomalia Peter și cheratită	M, N, ID, S, CR,P	Small eye	D	Domeniu de împerechere homeodomeniu
PAX3	2q36	Sindromul Waardenburg 1	M, N, ID, S, CR	Splotch	D	Domeniu de împerechere homeodomeniu
MITF	3q12–14	Sindromul Waardenburg 2	M, ID, S	Microftalmie	D	BHLH
HOXD13	2q31–32	Sinpolidactilia	Expansiunea polialaninei		D	Homeodomeniu
MSX2	5q34–35	Craniosinostoză, tip Boston	M (gain-of-function)		D	Homeodomeniu
EMX2	10q26	Schizencefalia	M, ID, S		D	Homeodomeniu

GLI3	7p13	Sindromul cefalo-polisindactilie Greig	CR, P	Degete supranumerare la picioare și deformarea anterioară a degetelor.	D	5 Zn finger familia C_2H_2
WT1	11p13	Tumora Wilms și sindromul Denys-Drash	Două puncte M, N, ID, S	K.O.	D*	4 Zn finger familia C_2H_2
THRB	3p22–24	Rezistența generalizată la hormonul tiroidian	M, N, ID	K.O.	D	2 Zn finger familia C_2H_2
ESR	6q25	Rezistența la estrogeni	N	K.O.	R	2 Zn finger familia C_2H_2
AR	Xq11–12	Sindromul de insensibilitate la androgeni, boala Kennedy și cancerul de sân la bărbați	M, N, ID repetiții (CAG) M(607/608)	Tfm	X X X	2 Zn finger familia C_2H_2
VDR	12q12–14	Rezistența la vitamina D și predispoziția pentru osteoporoză	M, N polimorfism alelic		R	2 Zn finger familia C_2H_2

DAX1	Xp21	Hipoplazie congenitală adrenală X-linkată: hipogonadotropic, hipogonadism și transformarea sexuală dependentă de doză	M, N, ID, CR duplicație		X X	Nou
HMG1C	12q14–15	Lipoamele și tumorile benigne		Pygmy, K.O.	D	AT-hook
SRY	Yp11	Transformarea sexuală	M, N, ID, CR		Y	Domeniu HMG
SOX9	17q24	Transformarea sexuală și alte displazii	M, N, ID, S, CR, P		D	Domeniu HMG
ATRX	Xq13	Retardarea mentală X-linkată asociată cu alfa talasemie	M, N, CR		X	helical
CBP	16q13	Sindromul Rubinstein-Taybi	N, CR		D	
VHL	3q25–26	Boala von Hippel-Lindau	M, N, ID, S, CR		D*	
TP53	17p13	Tumorile somatice și sindromul Li-Fraumeni	Două puncte M,N,ID,S	K.O.	D*	

Tipul mutației: CR- rearanjament cromozomal, ID- inserție sau deleție mica, M- missense, N- nonsens, P- efect de poziție, S- situsul pentru splicing

Model omolog la șoarece: K.O.- *Knockout*,

Tip de ereditate: D- dominant, R- recisiv, X- X lincat, Y- Y lincat,

*- gene supresoare tumorale: predispoziție generală la dezvoltarea tumorilor la indivizii constituțional heterozigoți, dar procesul malign este declanșat de pierderea copiei intacte a genei.

CAPITOLUL IX

GENOMUL SISTEMELOR MACROMOLECULARE ACELULARE: VIRUSURI, VIROIZI, VIRUSOIZI, PRIONI

1. INTRODUCERE

Virusurile au fost descrise ca agenți patogeni, care se pot multiplica numai în interiorul celulelor și care, datorită dimensiunii lor reduse, pot traversa filtrele bacteriologice.

În anul 1930, utilizându-se tehnici de ultracentrifugare, a devenit posibilă separarea virusurilor de componentele celulei gazdă. Anterior apariției microscopului electronic, natura virusurilor a fost incertă, ele fiind considerate gene nude care pot trece de la o celulă la alta. În anul 1952, s-a arătat că din bacteriofagul T_4 pătrunde în bacteria gazdă doar ADN fagic, care dirijează replicarea și asamblarea a sute de virusuri progene, în fiecare celulă infectată. Pe baza acestor observații, s-a considerat că virusurile sunt elemente genetice închise într-un înveliș, care are rol de protecție și transfer de la o celulă la alta. La unele virusuri, s-a observat prezența unui înveliș suplimentar, denumit anvelopă. Ulterior, s-a arătat că acest înveliș, cu structură asemănătoare membranei celulare, se formează în timpul eliberării particulelor virale din celula gazdă.

Organizarea acelulară, prezența unui singur tip de acid nucleic (ADN sau ARN), replicarea acestora prin utilizarea aparatului de replicare al celulei infectate etc., sunt caracteristici care deosebesc radical virusurile de toate sistemele biologice. Toate sistemele biologice cunoscute, de la cele mai simple bacterii (micoplasme) până la om, prezintă organizare celulară, conțin ambele tipuri de acizi nucleici și se multiplică prin diviziunea unei celule preexistente. Virusurile nu prezintă nici una dintre aceste caracteristici, din care cauză, celebrul virusolog francez, de origine rusă, Andre Lwoff, a propus o butadă ce definește asemenea particule infecțioase supramoleculare nucleo-proteinice: „*Virusurile sunt virusuri, pentru că virusurile sunt virusuri și nimic altceva*".

2. DIMENSIUNEA VIRUSURILOR

Dimensiunea virusurilor este foarte variată, inclusiv în cadrul aceleeași familii de virusuri. Cele mai mari virusuri sunt *poxvirusurile* (450nm lungime) și *orthopoxvirusurile* (240–300µm), iar cele mai mici sunt *enterovirusurile* (sub 30 µm).

3. STRUCTURA VIRUSURILOR

Virusurile sunt alcătuite dintr-un miez, un înveliș extern (capsida), și un înveliș suplimentar, facultativ (anvelopa). Miezul particulei virale conține materialul genetic viral (ADN sau ARN) și uneori proteine (enzime) accesorii.

3.1. CAPSIDA VIRALĂ

Capsida virală este alcătuită din subunități proteinice numite capsomere, care sunt interconectate prin legături fizico-chimice necovalente. Subunitățile proteinice ale capsidei virale sunt redundante (prezente în mai multe copii per particulă virală), astfel încât distrugerea unei subunități, nu alterează asamblarea întregii particule virale.

La bacteriofagi, au fost descrise trei tipuri de capside: helicală, icosaedrică și o combinație a celor două tipuri, alcătuită dintr-un cap icosaediric și o coadă filamentoasă (Fig 1).

Virusurile cu structură simplă, ca de exemplu *VMT* (virusul mozaicului tutunului), au capsida formată dintr-un singur tip de proteină (protomeră), ce se autoasamblează spontan în jurul materialului genetic, rezultând un virion în formă de baghetă, cu simetrie helicală (Fig 2). Fraenkel-Conrat și Williams (1955) au observat că dacă într-o soluție sunt amestecate proteine capsidale și ARN purificate de la *VMT*, are loc autoasamblarea spontană a particulelor virale.

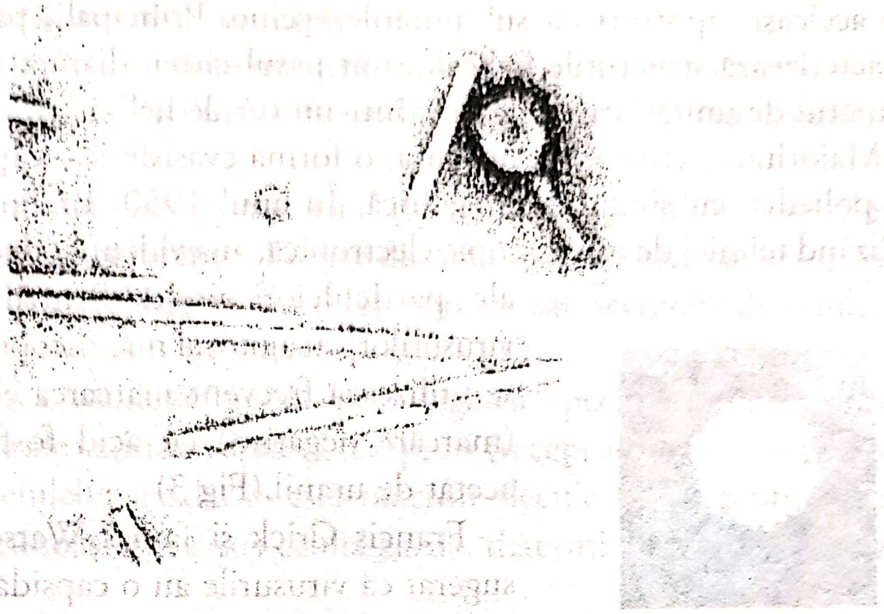


Fig. 1 — Principalele tipuri de capside virale: icosaedrică (central), helicală (partea stângă jos) și capsidă complexă (partea dreaptă sus) (După Jay A. Levy, 1994).

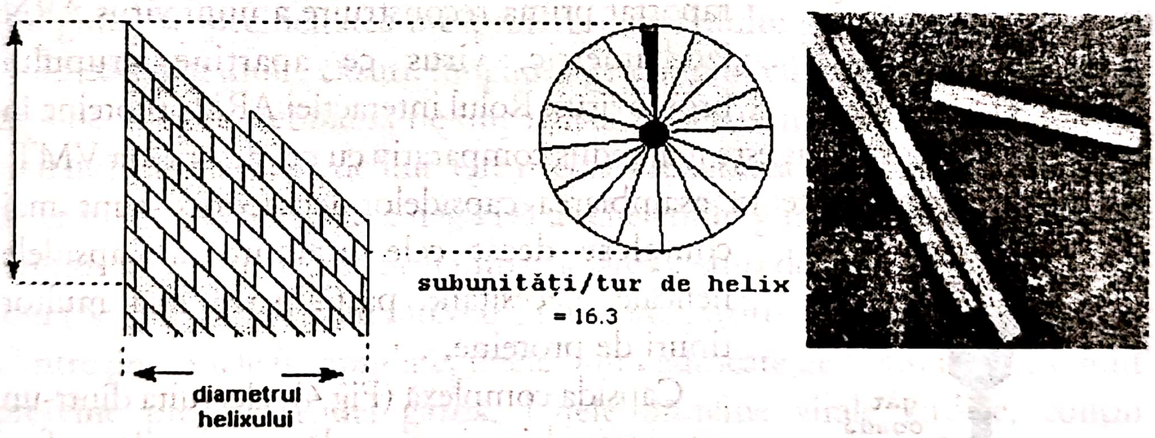


Fig. 2 — Caracterizarea unei structuri helicale (stânga) și VMT (dreapta) cu aspect de baghetă rigidă. Unele virusuri helicale au flexibilitate considerabilă, fiind întâlnite sub formă curbă sau îndoită. Flexibilitatea este o caracteristică importantă a virusurilor, deoarece îndoirea previne ruperea virusurilor, atunci când asupra lor acționează forțe mecanice din mediu. (http://www.tulone.edu/~dmsander/www/109/structure.html)

Capsida de tip helical a fost descrisă și la fagii *M13*. Pentru a realiza o structură helicală, subunitățile proteinice asimetrice, dar identice, sunt așezate pe circumferința unui cerc, formând un disc. Prin suprapunerea unor discuri identice se formează structura helicală, în care fiecare unitate structurală are aceleași raporturi cu subunitățile vecine. Principalii parametrii care caracterizează structurile helicale sunt pasul elicei, diametrul helixului și numărul de unități care se găsesc într-un tur de helix.

Majoritatea virusurilor au, însă, o formă cvasisferică, capsida lor fiind un poliedru cu simetrie icosaedrică. În anul 1950, Brenner și Horner, utilizând tehnici de microscopie electronică, au evidențiat detalii stucturale ale particulelor virale. Pentru evidențierea virusurilor, cu ajutorul microscopului electronic, se utilizează frecvent marcarea electronodensă (marcare negativă) cu acid fosfotungstic sau acetat de uranil.(Fig 3)

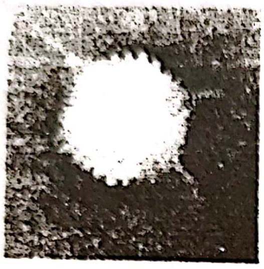


Fig. 3 — Imagine electronomicroscopică a unei particule virale, marcată negativ. (După R.C. Williams)

Francis Crick și James Watson (1956) au sugerat că virusurile au o capsidă alcătuită din proteine identice, aranjate după o simetrie helicală sau cubică (icosaedrică).

Capsida icosaedrică au fost descrisă la fagii *MS2* și *PM2*. Bancroft și colab (1960) au raportat prima reconstruire a unui virus ARN izodiametric, virus ce aparține grupului bromovirus. Rolul interacției ARN- proteine în asamblarea acestui virus este mai redus comparativ cu cel descries la VMT. Mecanismele implicate în asamblarea capsidelor icosaedrice sunt mai complexe decât cele întâlnite la capsidele helicale, necesitând participarea mai multor tipuri de proteine.

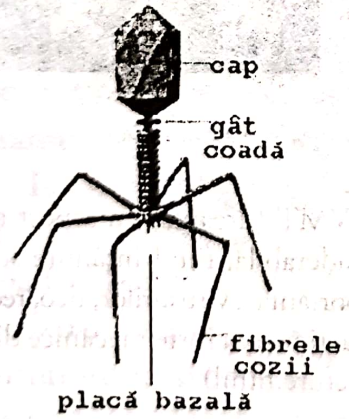


Fig. 4 — Structura unui virus din seria T par (după Jay A. Levy)

Capsida complexă (Fig 4), alcătuită dintr-un cap icosaedric și o coadă contractilă a fost întâlnită la fagii *T4* și λ, de la *E. coli* și fagul *SPO1*, de la *Bacillus subtilis*. La extremitatea cozii se găsește o placă, cu rol în atașarea și penetrarea celulei gazdă.

Asamblarea capsidelor complexe, în interiorul gazdei, se realizează în etape succesive, controlate de proteine virale specifice. În cursul acestor etape rezultă particule subvirale, care ulterior se asociază și formează virionul complet.

Capsida virală are roluri multiple:

-determină forma și dimensiunea virusului. Capsida poate avea, în general, formă: helicală (cilindrică), izodiametrică (sferică) sau icosaedrică (cubică).

-protejează materialul genetic viral de acțiunea agenților: fizici (forțe mecanice), chimici (substanțe chimice din mediu, cu potențial genotoxic), enzimatici (nucleaze eliberate din celule moarte sau secretate de celule, ca mecanism de apărare).

-recunoașterea celulelor gazdă prin legarea specifică între anumite macromolecule ale capsidei virale și receptori (receptorii de virus) prezenți pe suprafața celulelor gazdă. Aceste macromolecule (antireceptori), care participă la recunoașterea virus-celulă gazdă, determină spectrul de gazdă al virusului.

-determinanții antigenici ai macromoleculelor de pe suprafața capsidei activează răspunsul imun și sinteza anticorpilor protectori în organismele animale infectate (Zarnea, 1983).

La încapsidarea genomului viral apar probleme legate de dimensiunea (lungime) și specificitatea încapsidării materialului genetic viral.

În cele mai multe cazuri, lungimea genomului viral depășește diametrul capsidei în care trebuie să fie împachetat. Pentru încapsidarea genomului viral într-un spațiu predefinit, este necesară reducerea repulsiei electrostatice, determinate de încărcarea negativă a scheletului glucidofosforic. Repulsia electrostatică este redusă prin împachetarea alături de acidul nucleic a unor ioni (Na^+, K^+, Mg^{++}) sau molecule încărcate pozitiv (poliamine, proteine). Dintre proteinele încapsidate, unele sunt codificate de virus, iar altele sunt proteine proprii celulei gazdă. Unele proteine virale tardive, conțin aminoacizi bazici (arginină, lizină), care, prin legare de acidul nucleic viral, îi favorizează încapsidarea. Alte virusuri cu genom ADN dublu catenar, conțin molecule histon-like, asociate strâns cu ADN. Astfel, în genomul virusului *polioma*, s-au descris structuri asemănătoare cromatinei, formate prin asocierea materialului genetic viral cu proteine histonice, asemănătoare celor din genomul gazdei.

Problema specificității încapsidării genomului viral apare la majoritatea virusurilor. Această problemă este rezolvată parțial prin acumularea materialului genetic viral și reducerea sintezei constituenților celulari. În acest fel, șansa încapsidării eronate este mult redusă. Diferite virusuri au strategii diferite de încapsidare specifică a propriului material genetic. Astfel, unele virusuri au o capsidă ce recunoaște specific materialul genetic viral, în timp ce la altele, proteine specifice nucleocapsidei, facilitează această recunoaștere. Virusurile cu genom mic, compact (retrovirusurile și rhabdovirusurile), pot codifica astfel de proteine de încapsidare. Alte virusuri conțin în genom o secvență specifică de nucleotide, care diferențiază acidul nucleic viral de acizii nucleici celulari și care îndeplinește rolul unui semnal specific de împachetare. La virusurile cu genom segmentat, mecanismele încapsidării specifice a genomului sunt și mai puțin cunoscute, deși, este presupusă existența unei interacții moleculare, specifice, între genom și capsidă.

3.2. ANVELOPA VIRALĂ

Anvelopa (peplos) este o structură virală accesorie, formată în timpul înmuguririi virusului la suprafața celulei (Fig 5) sau a membranei nucleare (herpesvirusuri).

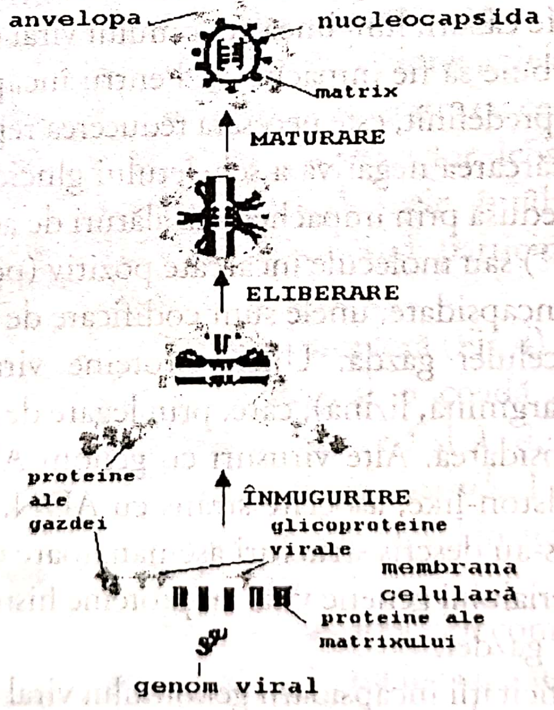

anvelopa
nucleocapsida
matrix
MATURARE
ELIBERARE
proteine ale gazdei
ÎNMUGURIRE
glicoproteine virale
membrana celulară
proteine ale matrixului
genom viral

Fig. 5 — Formarea anvelopei în timpul eliberării virusului din celula gazdă. (http://www.tulone.edu/~dmsander/www/109/structure.html)

Mecanismul formării anvelopei virale explică de ce anvelopa are o structură trilaminară, cu o compoziție lipoproteinică asemănătoare membranei plasmatice a celulei gazdă. Unele macromolecule sintetizate pe baza informației genetice virale ajung la nivelul membranei celulare. O parte din aceste macromolecule vor forma un strat de legătură între anvelopă și capsida virală (proteinele matrixului), iar restul macromoleculelor (în special glicoproteinele) vor rămâne expuse pe suprafața externă a anvelopei, formând spiculi (Fig 6).

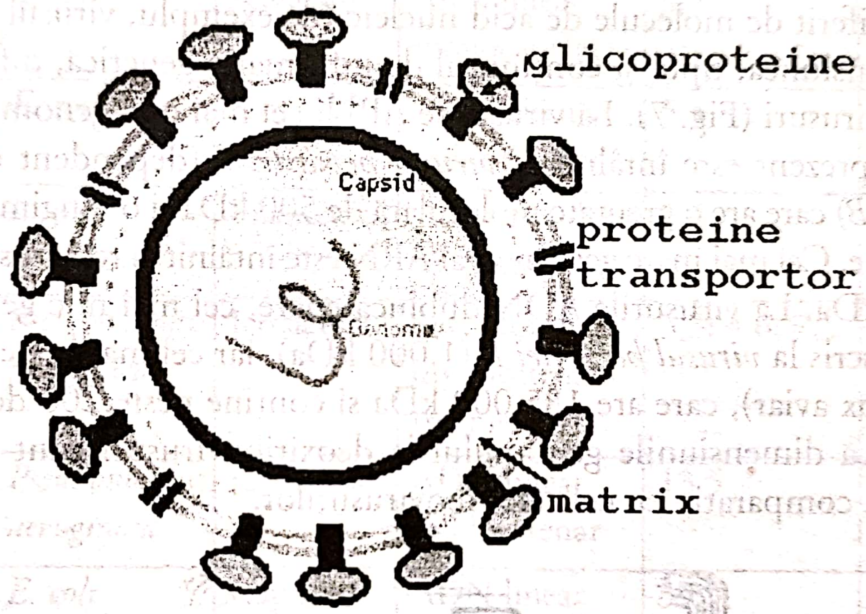


Fig. 6 — Structura unui virus anvelopat.
(http://www.tulone.edu/~dmsander/www/109/structure.html)

Diversitatea biochimică a glicoproteinelor de origine virală este redusă. Pe baza proprietăților structurale și funcționale, glicoproteinele pot fi subdivizate în:

-proteine care sunt ancorate în membrană printr-un singur domeniu transmembranar, având cea mai mare parte a moleculei expusă în mediul extern, spre interior rămânând o coadă relativ scurtă. Adesea, aceste proteine se asociază și formează spiculi vizibili la microscopul electronic, care sunt antigene majore ale anvelopei virale;

-proteine cu mai multe domenii transmembranare, formează canale ce străbat anvelopa și care au rol transportor.

Anvelopa virală protejează nucleocapsida și intervine în etapa de infecție virală (primele faze ale adsorbției virale).

3.3. GENOMUL VIRAL

Materialul genetic viral este reprezentat de macromolecule ADN (deoxiribovirusuri) sau ARN (ribovirusuri), mono sau dublucatenare, lineare sau circulare. Unele virusuri au genomul segmentat, fiind alcătuit dintr-un număr diferit de molecule de acid nucleic (de exemplu, virusul gripal).

Dimensiunea, tipul și conținutul de informație genetică, diferă foarte mult la virusuri (Fig. 7). La virusurile ARN, cel mai mic genom cunoscut până în prezent este întâlnit la *virusul hepatitei δ* (dependent de *virusul hepatitei B*) care are o greutate moleculară de 500 kDa și o lungime de 1678 nucleotide. Cel mai mare genom viral ARN este întâlnit la reovirusuri, având 15.000 kDa. La virusurile ADN dublucatenare, cel mai mic genom viral a fost descris la *virusul hepatitei B* (1.000 kDa), iar cel mai mare la *Avipox Virus* (Pox aviar), care are 185.000 kDa și conține peste 200 de gene. Se observă că dimensiunile genomului la deoxiribovirusuri sunt mult mai variabile, comparativ cu cele ale ribovirusurilor.

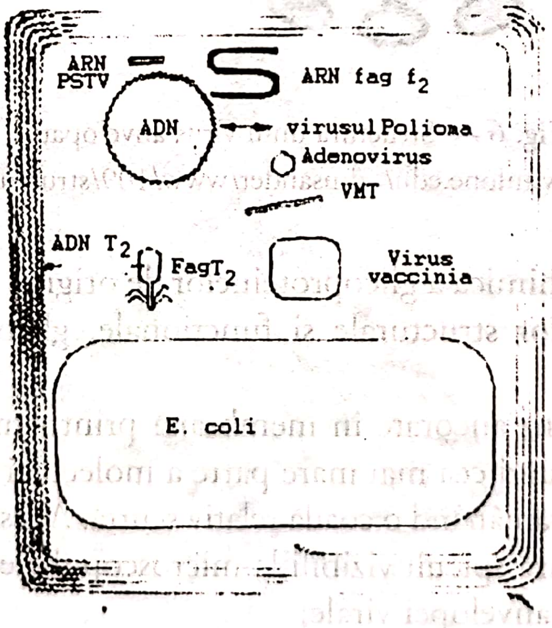


Fig 7 Comparație între dimensiunile genomului unor virusuri și bacteria *E. coli*. Cadrul exterior reprezintă simbolic ADN relaxat al fagului T_2.

Numărul de gene conținut în genomul viral, este cuprins între 3 (la *Polyoma)* și peste 200 de gene la *Avipox Virus* (Pox aviar).

Caracterizarea unor bacteriofagi

Fag	Gazda	Tipul capsidei	Genom	Dimensiunea genomului (Kb)	Numărul de gene
MS2	*E. coli*	Icosaedric	ARN linear monocatenar	3,6	3
ΦX174	*E. coli*	Icosaedric	ADN circular monocatenar	5,4	11
M13	*E. coli*	Filamentos	ADN circular monocatenar	6,4	10
Φ6	*Pseudomonas phaseolica*	Icosaedric	ARN linear dublucatenar (segmentat)	3,3; 4,6; 7,5	
PM2	*Pseudomonas aeruginosa*	Icosaedric	ADN linear dublucatenar	13,5	
T7	*E. coli*	Cap și coadă	ADN linear dublucatenar	39,9	55+
λ	*E. coli*	Cap și coadă	ADN linear dublucatenar	49,5	48
SPO1	*Bacillus subtilis*	Cap și coadă	ADN linear dublucatenar	150	
T2, T4, T6	*E. coli*	Cap și coadă	ADN linear dublucatenar	166	150+

"+" reprezintă numărul de gene cu funcții cunoscute.

Caracterizarea unor virusuri specifice organismelor eucariote

Fag	Gazdă	Tipul genomului (forma materialului genetic din particula virală)	Dimensiunea genomului (Kb)	Numărul de gene
Parvovirus	Mamifere	ADN linear monocatenar	1,6	5
Hepatita B	Mamifere	ADN circular parțial dublu catenar	3,2	4
VMT	Plante	ARN monocatenar linear	6,4	6
SV40	Maimuțe	ADN dublucatenar circular	5,0	5
Influenza	Mamifere	ARN monocatenar linear, segmentat	22,0	12
Retrovirusuri	Mamifere Păsări	ARN monocatenar linear	6,0–9,0	3
Poliovirus	Mamifere	ARN monocatenar linear	7,6	8
Reovirus	Mamifere	ARN monocatenar/ dublucatenar, segmentat	22,5	22
Adenovirus	Mamifere	ADN dublucatenar, linear	36,0	30
Vaccinia	Mamifere	ADN dublucatenar, circular	240	240

4. PARTICULARITĂȚI ALE GENOMULUI VIRUSURILOR ADN

La fagii din seria *T-par* (Fig. 8), genomul ADN dublu catenar este linear, redundant terminal (~ 1.000 nucleotide) și permutat circular. ADN viral este replicat prin mecanisme care conduc la formarea unor molecule poligenomice, concatenate. În cursul asamblării particulei virale, aceste molecule sunt tăiate de enzime (endonucleaze) care acționează specific în funcție de lungimea genomului fagic și nu de secvența acestuia.

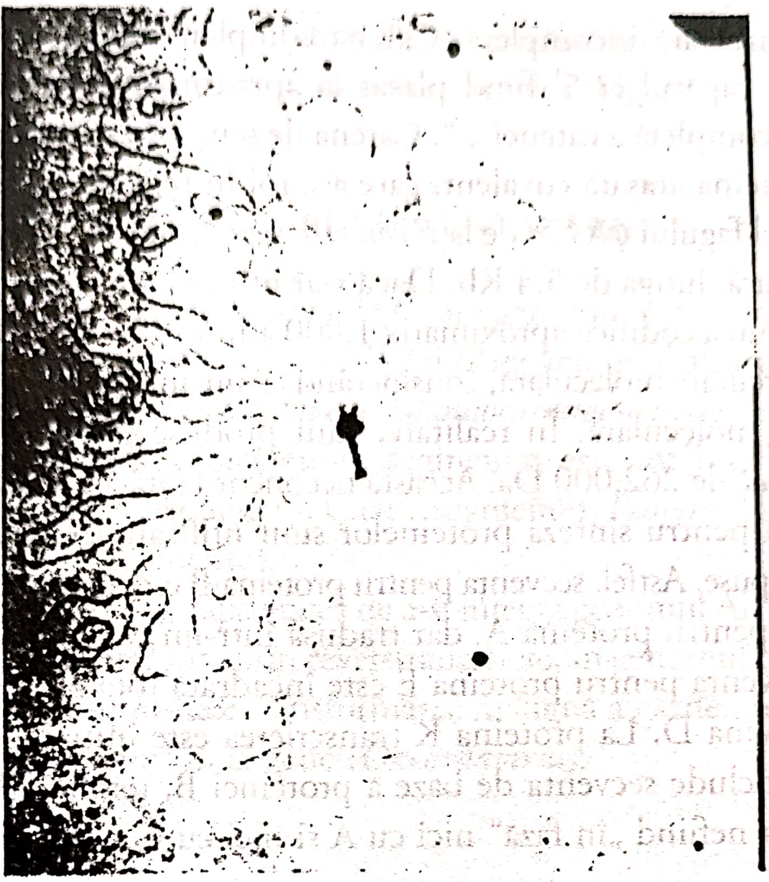


Fig. 8 — ADN bicatenar al fagului T2, eliberat din capsidă prin șoc osmotic, prezentând două capete libere (după Kleinschmidt, 1962).

Fragmentele unigenomice rezultate au dimensiuni puțin mai mari decât genomul viral integral.

Fagul λ are genomul ADN dublucatenar, cu extremități monocatenare complementare (cozi adezive), lungi de aproximativ 12 baze. Genomul acestui fag conține aproximativ 50 de gene. După infectarea gazdei are loc circularizarea materialului genetic viral prin unirea capetelor coezive. Lipsa permutării circulare, a redundanței terminale și formarea capetelor coezive sunt datorate enzimei care separă monomerii ADN în momentul încapsidării. Această enzimă are specificitate de secvență dar nu de lungime, cum se întâmplă la fagii din seria T par.

La virusurile *Polioma* și *SV40*, genomul ADN este dublu catenar circular covalent închis, care prezintă aproximativ douăzeci de răsuciri superhelicale.

Virusul hepatitei B (*HBV*) are genomul reprezentat de o moleculă ADN parțial dublucatenară. Catena de sens „-", de 3200 nucleotide, este o moleculă circulară incompletă. Catena complementară, are 1700–2800 nucleotide, capătul ei 5' fiind plasat la aproximativ 300 nucleotide de regiunea incompletă a catenei „-". Catena de sens „-" este blocată la capătul 5' de o proteină atașată covalent, care are rol în replicarea virusului.

Genomul fagului *φX174* de la *E.coli* este reprezentat de o moleculă ADN monocatenară, lungă de 5,4 Kb. Dacă s-ar utiliza doar un singur cadru de citire, s-ar putea codifica aproximativ 1.800 aminoacizi și cel mult 197.000 unități de greutate moleculară, considerând că un aminoacid are 110 unități de greutate moleculară. În realitate, sunt produse proteine fagice, cu o greutate totală de 262.000 Da. Această neconcordanță a fost clarificată când s-a arătat că pentru sinteza proteinelor sunt utilizate trei cadre de citire, parțial suprapuse. Astfel, secvența pentru proteina B este conținută totalmente în secvența pentru proteina A, dar tradusă într-un cadru de citire diferit. Similar, secvența pentru proteina E este încadrată totalmente în secvența pentru proteina D. La proteina K transcrierea este inițiată lângă capătul genei A și include secvența de baze a proteinei B, teminându-se în gena C, sinteza sa nefiind „în fază" nici cu A și nici cu C. Organizarea acestui

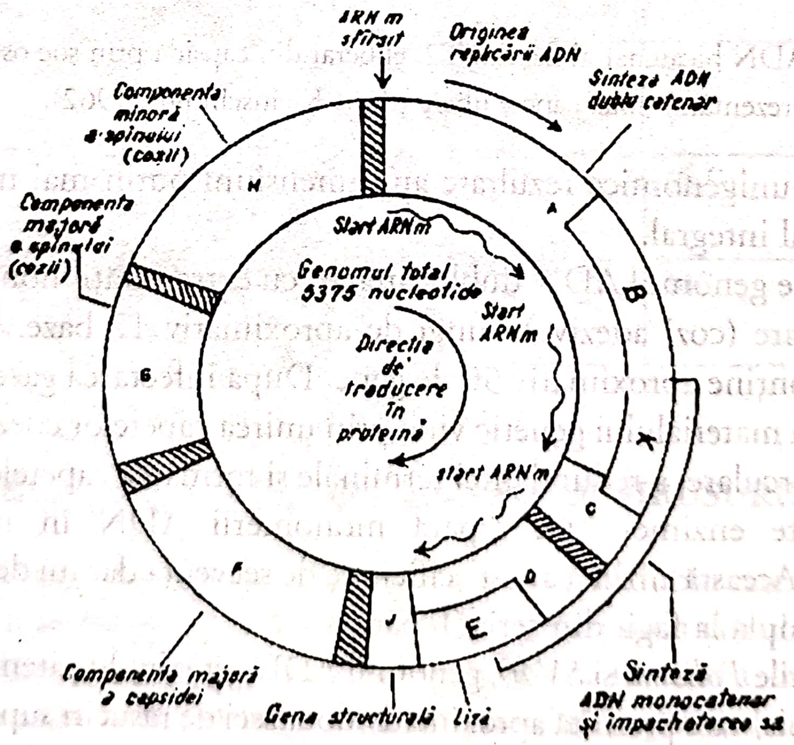

ARN m sfîrsit
Originea replicării ADN
Sinteză ADN dublu catenar
Componenta minoră a spinului (cozii)
Componenta majoră a spinului (cozii)
H
A
B
K
C
D
E
J
F
G
Start ARNm
Genomul total 5375 nucleotide
Start ARNm
Direcția de traducere în proteină
start ARNm
Componenta majoră a capsidei
Gena structurală
Liză
Sinteză ADN monocatenar și împachetarea sa

Fig 9 Reprezentarea genomului fagului *φx174*.

genom, permite creșterea cantității de informație genetică care poate fi codificată de un genom viral de dimensiuni mici (Fig 9)

5. VIRUSURI CU GENOM ARN

Virusul mozaicului tutunului (VMT) are genomul reprezentat de ARN monocatenar linear, iar fagii *R17*, *MS2* și *f2* au genomul alcătuit din ARN monocatenar intens pliat. *Virusul encefalomiocarditei șoarecelui* are genomul alcătuit din ARN circular. Genom segmentat este întâlnit la virusurile *Influenza* (A și B cu 8 segmente și C cu 7 segmente), *Reovirus* (10 segmente) și *Arenavirusuri* (2 segmente).

Unele ribovirusuri au capacitatea de a-și integra genomul ARN sub forma unor copii ADN sintetizate prin reverstranscriere, în genomul celulei gazdă. Aceste virusuri pot produce transformarea malignă a gazdei, motiv pentru care se numesc virusuri oncogene (*Oncornavirus*).

6. SPECIFICITATEA VIRUSURILOR PENTRU GAZDĂ

Specificitatea virusurilor pentru gazdă este diferită, unele virusuri pot infecta culturi celulare de la diferite specii, pe când altele, cum sunt virusurile hepatitei A și B, nu infectează nici un tip de culturi celulare. Specificitatea virusurilor pentru gazdă depinde de morfologia virusului, mecanismul fixării pe celula gazdă, precum și de unele caracteristici particulare ale gazdei. Pe suprafața celulei gazdă, există constituenți normali, care pot funcționa și ca receptori pentru virus. Pe suprafața virusurilor există structuri specializate, denumite antireceptori, care se pot lega specific de receptorii celulari. Receptorii celulari pot fi alterați prin mutații sau prin mecanisme fiziologice, fapt ce determină instalarea rezistenței celulare la infecția cu anumite virusuri.

Receptorii celulari și antireceptorii virali, sunt formațiuni glicoproteinice între care se realizează asocieri pe bază de complementaritate, după principiul cheie-lacăt, stabilizate de forțe fizico-chimice. Gradul de complementaritate dintre receptorii celulari și antireceptorii virali, conferă sensibilitate sistemului celulă gazdă-virus. În lipsa complementarității, celula este rezistentă la infecția virală specifică.

Prezența moleculelor care pot funcționa ca receptori pentru virus, este un dezavantaj pentru celule, motiv pentru care, în timp, au evoluat atât celulele cât și virusurile. Componentele celulare de suprafață au evoluat spre a fi recunoscute de un număr cât mai mic de virusuri, iar virusurile au evoluat astfel încât să recunoască specific acele tipuri celulare în care se pot multiplica optim. În momentul de față, nu există virusuri care să nu prezinte specificitate pentru nici un tip de gazdă.

Celulele vegetale, datorită structurii lor, nu prezintă receptori pentru virus, ceea ce face ca virusurile plantelor să prezinte o specificitate de gazdă scăzută. Virusurile nu pot adera la peretele celulozo-pectic al celulei vegetale, decât atunci când integritatea peretelui a fost afectată. Chiar și în acest caz, infecția plantelor necesită mari cantități de virus. Infecția, odată realizată, este urmată de multiplicare virală.

Un mecanism primordial de „apărare“ împotriva virusurilor este sistemul de restricție – modificare, descris la bacterii. Enzimele de restricție, clivează materialul genetic viral la nivelul unor situsuri specifice. Pentru ca enzimele de restricție să nu degradeze și materialul genetic propriu, enzimele de modificare acționează asupra bazelor azotate din propriile situsuri de restricție și le modifică, în special, prin metilare.

La bacteriofagi s-a constatat o specificitate de gazdă, care poate fi limitată la o specie, sau câteva subspecii de bacterii. Astfel, nici un fag care infectează genul *Pseudomonas* nu poate infecta și *E. coli*. Mai mult, unii fagi pot fi crescuți în *P. fluorescens,* dar nu și în *P. aeruginosa*. Această specificitate de gazdă este explicată prin existența unor receptori diferiți prezenți pe suprafața celulară. La bacteriofagi, cea mai specializată structură pentru fixarea de celula gazdă este reprezentată de placa bazală, cu croșetele și filamentele cozii (Fig 4).

La *Myxovirus,* locusul inițial de interacție de pe suprafața celulară, este reprezentat de o substanță mucoidă, glicoproteinică, ce conține resturi de acid neuraminic (acid sialic), iar contactul virus-celulă este stabilit prin intermediul spiculilor de hemaglutinine prezenți pe suprafața virionilor. Stratul mucos al celulei este dizolvat local sub acțiunea neuraminidazei virale, făcând astfel posibilă pătrunderea virusului în celulă.

Receptorul celular pentru *Adenovirusuri* este alcătuit din două polipeptide, una, de 78kDa, pare a fi un constituent principal al tonofibrilelor celulare, iar celălalt are funcție încă necunoscută.

Virusurile din grupul *Pox* se leagă de membrana celulară, prin intermediul structurilor tubulare de pe suprafața lor.

7. PARAZITISMUL VIRAL

Parazitismul viral este de tip special. Virusul este un parazit absolut la nivel genetic, care este deosebit de parazitismul microorganismelor.

Cele mai simple procariote parazite obligatoriu în celulele eucariote, (de exemplu, *ricketsiile*, *chlammidiile*) își păstrează integritatea structurală și funcțională în toate etapele ciclului de reproducere, au metabolism propriu, cresc și se multiplică prin diviziune directă. Astfel, deși parazite intracelular obligatorii, ele provin din diviziunea unei celule preexistente.

Virusurile nu au un metabolism propriu; ele nu se pot multiplica singure ci sunt multiplicate de celula gazdă. În timpul infecției integritatea virusului nu se păstrează; spre exemplu, virusul T_4 injectează în celula gazdă doar materialul genetic, capsida rămânând în afara celulei. După replicarea ADN fagic în interiorul celulei gazdă bacteriene și sinteza proteinelor fagice de către mașinăria de replicare, respectiv de către mașinăria de transcripție și traducere ale celulei gazdă, are loc procesul de autoasamblare a materialului genetic viral progen și a proteinelor virale, cu reconstituirea de noi particule virale mature (virioni). Astfel, virusurile nu se multiplică prin ele însele, ci sunt multiplicate de către celula gazdă. Virusurile oferă doar planurile arhitecturale deținute în molecula de acid nucleic viral pătruns în celula gazdă.

8. CLASIFICAREA VIRUSURILOR

Dezvoltarea tehnicilor moderne de biologie moleculară a permis identificarea și caracterizarea unui număr mare de virusuri, astfel încât a devenit necesară clasificarea lor. Sistemele de clasificare actuale plasează virusurile separat de sistemele biologice, pentru a sublinia statutul lor particular de sisteme supramoleculare nucleoproteinice, indisolubil legate însă de sistemele biologice. Clasificarea virusurilor se bazează pe caracteristici virale structurale și funcționale, deoarece s-a constatat că tipul acizilor nucleici virali, structura învelișului, modul în care infectează celula gazdă, mecanismul

Virusurile din grupul *Pox* se leagă de membrana celulară, prin intermediul structurilor tubulare de pe suprafața lor.

7. PARAZITISMUL VIRAL

Parazitismul viral este de tip special. Virusul este un parazit absolut la nivel genetic, care este deosebit de parazitismul microorganismelor.

Cele mai simple procariote parazite obligatoriu în celulele eucariote, (de exemplu, *ricketsiile*, *chlammidiile*) își păstrează integritatea structurală și funcțională în toate etapele ciclului de reproducere, au metabolism propriu, cresc și se multiplică prin diviziune directă. Astfel, deși parazite intracelular obligatorii, ele provin din diviziunea unei celule preexistente.

Virusurile nu au un metabolism propriu; ele nu se pot multiplica singure ci sunt multiplicate de celula gazdă. În timpul infecției integritatea virusului nu se păstrează; spre exemplu, virusul T_4 injectează în celula gazdă doar materialul genetic, capsida rămânând în afara celulei. După replicarea ADN fagic în interiorul celulei gazdă bacteriene și sinteza proteinelor fagice de către mașinăria de replicare, respectiv de către mașinăria de transcripție și traducere ale celulei gazdă, are loc procesul de autoasamblare a materialului genetic viral progen și a proteinelor virale, cu reconstituirea de noi particule virale mature (virioni). Astfel, virusurile nu se multiplică prin ele însele, ci sunt multiplicate de către celula gazdă. Virusurile oferă doar planurile arhitecturale deținute în molecula de acid nucleic viral pătruns în celula gazdă.

8. CLASIFICAREA VIRUSURILOR

Dezvoltarea tehnicilor moderne de biologie moleculară a permis identificarea și caracterizarea unui număr mare de virusuri, astfel încât a devenit necesară clasificarea lor. Sistemele de clasificare actuale plasează virusurile separat de sistemele biologice, pentru a sublinia statutul lor particular de sisteme supramoleculare nucleoproteinice, indisolubil legate însă de sistemele biologice. Clasificarea virusurilor se bazează pe caracteristici virale structurale și funcționale, deoarece s-a constatat că tipul acizilor nucleici virali, structura învelișului, modul în care infectează celula gazdă, mecanismul de replicare a materialului genetic viral etc., diferă considerabil de la un tip de virus la altul. Principalele criterii de clasificare a virusurilor sunt:

1. Simetria capsidei; după acest criteriu, virusurile sunt: **helicale** (ex. *VMT*), **icosaedrice** (ex. *MS2*) și **complexe** (ex. *T4*)
2. Prezența anvelopei; virusurile sunt **anvelopate** sau **neanvelopate**.
3. Clasificările bazate pe **specificitatea de gazdă** sau **boala** produsă sunt mai puțin elocvente, deoarece sunt situații în care un virus poate infecta mai multe tipuri celulare sau virusuri diferite pot produce simptome asemănătoare.
4. Pe baza **ciclului de replicare**, virusurile sunt grupate în **lizogene și litice**.

Cele două tipuri de replicare sunt cel mai bine cunoscute la bacteriofagi.

Ciclul litic este bine descris la fagii din seria T. Acești fagi au genomul alcătuit dintr-o singură moleculă de ADN dublu catenară, cu o dimensiune de $\sim 2x10^5$ pb, la fagii seriei T par, și de $\sim 4x10^4$ pb, la cei din seria T impar. Capsida lor este complexă, prezentând un cap icosaedric, plin cu ADN și o coadă proteinică, cu simetrie helicală. După injectarea genomului fagic în celula gazdă *E. coli,* începe multiplicarea virusului, formându-se aproximativ 100 de particule fagice, în 20 minute. Multiplicarea fagului este urmată de liza celulei gazdă și eliberarea noilor particule virale.

Ciclul lizogen este întâlnit la fagii temperați. Reprezentantul tipic al acestei clase este bacteriofagul l care are materialul genetic reprezentat de ADN dublu catenar. După infecția gazdei, fagul se poate multiplica pe calea ciclului litic (după modelul fagilor T par) sau pe calea ciclului lizogen. Ciclul lizogen presupune circularizarea ADN viral și integrarea sa printr-un mecanism asemănător crossing-over-ului, într-un situs specific din cromozomul gazdei. Procesul de integrare este controlat de un complex enzimatic specific. Genomul viral integrat în cromozomul gazdei se numește *profag,* iar bacteria care conține un provirus desfășoară un ciclu lizogen și se numește *progenă,* toate celulele rezultate din diviziunea ei moștenind și profagul. Menținerea virusului sub formă de profag este dependentă de exprimarea unor gene virale. La un moment dat are loc excizia cromozomului viral din genomul gazdei și începe multiplicarea sa, după modelul fagilor litici. Multiplicarea virusului este urmată de distrugerea celulei gazdă și eliberarea noilor particule virale în mediu.

9. CLASIFICAREA BACTERIOFAGILOR

Clasificarea bacteriofagilor se poate realiza pe baza criteriilor prezentate anterior. Cele mai utilizate clasificări sunt totuși cele bazate pe tipul acidului nucleic din care este alcătuit materialul lor genetic (bacteriofagi ADN șiARN) și pe tipul ciclului de replicare (bacteriofagi litici și lizogeni).

10. CLASIFICAREA VIRUSURILOR FUNGALE

Majoritatea virusurilor fungale au fost izolate de la fungii superiori, mai ales de la *Penicillium sp.* și *Aspergilius sp.* Materialul genetic al acestor virusuri este reprezentat de o moleculă ARN dublu catenar, protejat de o capsidă izodiametrică, cu diametrul de 25–50 nm.

Virusurile fungale sunt în general virusuri latente, efectele citopatice și produșii toxici de origine virală fiind foarte greu identificate. Totuși, la *Agaricus bisporus* au fost observate semne ale infecției virale.

Virusurile fungilor mici sunt și mai puțin cunoscute. Virusurile caracterizate până acum, dimensiuni cuprinse între 40–200nm, capsidele izometrice sau hexagonale și genomul dublu catenar ADN sau ARN. Ciclul lor de multiplicare se finalizează cu liza celulei gazdă și eliberarea noilor particule virale.

În fungi se pot multiplica virusuri din familiile *Totiviridae* și *Partitiviridae*.

11. CLASIFICAREA VIRUSURILOR ALGALE

Studiile realizate în acest domeniu sunt limitate, virusurile algelor fiind puțin cunoscute. Din punct de vedere structural, virusurile algelor prezintă un genom ADN dublu catenar și o capsidă poliedrică. O structură asemănătoare cozii bacteriofagilor a fost descrisă la virusul care se multiplică în alga *Uronema gigas*.

12. CLASIFICAREA VIRUSURILOR PLANTELOR

Existența virusurilor la plante a fost sugerată cu mult timp în urmă, prin intermediul bolilor pe care le produc. Creșterea virusurilor vegetale este, însă, mult mai dificilă, comparativ cu a virusurilor animale. Din cauza dificultăților legate de izolare și de creștere, virusurile plantelor sunt mult mai puțin cunoscute, comparativ cu bacteriofagii sau cu virusurile animalelor.

Clasificările virusurilor plantelor pe baza caracteristicilor genomului, capsidei sau anvelopei, sunt incomplete, mai utilizate fiind clasificările bazate pe caracteristicile fizice ale virusurilor și pe bolile produse.

La virusurile vegetale s-au evidențiat următoarele tipuri de capside: helicale (ex. *VMT)* rigide sau flexibile, icosaedrice tipice sau modificate prin adiția unor capsomere suplimentare (ex. la virusul napului galben). În interiorul capsidei, în general, nu s-au evidențiat proteine virale specifice.

1. Virusurile plantelor se clasifică pe baza materialului genetic în virusuri ADN și virusuri ARN.

2. Virusurile vegetale ADN sunt neanvelopate. Ele pot avea genomul ADN dublu catenar (*Caulimovirus*) sau monocatenar (*Geminivirus*).

Virusurile vegetale ARN pot avea sau nu anvelopă.

Virusurile ARN, neanvelopate, la rândul lor, se subdivid în:

- virusuri cu genom ARN monocatenar (*Bromovirusurile*, *Nepovirusurile*, *Cucumovirusurile*, *Luteovirusurile*); cele mai multe virusuri vegetale sunt ARN monocatenare, neanvelopate.
- virusuri cu genom ARN dublu catenar (*Reoviridae*).

Virusurile ARN monocatenare, anvelopate, sunt reprezentate de familia *Rhabdoviridae*.

Specificitatea pentru gazdă a membrilor familiilor *Reoviridae* și *Rhabdoviridae* este mai redusă, ele putându-se multiplica atât în plante cât și în unele specii de nevertebrate.

13. VIRUSURILE INSECTELOR

Virusurile insectelor sunt relativ puțin cunoscute, cel mai bine caracterizate fiind virusurile din familia *Baculoviridae*, care sunt utilizate în experimentele de inginerie genetică. În insecte se pot multiplica virusurile din familiile *Baculoviridae, Iridoviridae, Poxviridae, Reoviridae, Parvoviridae, Picornaviridae, Rhabdoviridae.*

Familia *Iridoviridae* conține virusuri neanvelopate, care au capsidă icosaedrică de 125–300 nm și genom ADN dublu catenar, permutat circular.

Virusurile din familia *Poxviridae* au genomul ADN dublu catenar, care prezintă la extremități secvențe inversate. Miezul particulei virale conține enzimele necesare sintezei ARNm.

Reprezentanții familiei *Parvoviridae* au capside icosaedrice de 18–26 nm și genomul reprezentat de ADN monocatenar.

14. CLASIFICAREA VIRUSURILOR ANIMALE

Clasificarea virusurilor, bazată pe natura materialului genetic, realizată de Baltimore (1996), este una dintre cele mai utilizate. Acesta diferențiază virusurile în ribovirusuri (al căror material genetic este reprezentat de ARN) și deoxiribovirusuri (informația genetică este înmagazinată în ADN). Acizii nucleici virali prezintă diferite structuri și conformații, putând fi monocatenari (ADNmc, ARNmc) sau dublu catenari (ADNdc, ARNdc), lineari sau circulari, uneori existând chiar o alternanță între forma lineară și cea circulară, în cadrul aceluiași genom (cazul virusului lambda). De fapt, această diversificare structurală reflectă strategiile genetice extrem de variate pe care le adoptă virusurile pentru a-și asigura multiplicarea lor de către celulele gazdă. Caracteristicile multiplicării virusurilor sunt dependente de tipul acidului nucleic viral și de modul în care se sintetizează moleculele de ARNm viral.

Pentru a identifica catenele virale, polaritatea lor a fost stabilită prin convenție; astfel, ribovirusurile cu materialul genetic reprezentat de ARN care este direct traductibil în celula gazdă (funcționează ca ARNm), au fost considerate virusuri cu ARN „+“, iar cele cu genom ARN care nu este direct traductibil în celula gazdă, fiind de tip antimesager, sunt considerate de polaritate negativă „-“. În cazul acizilor nucleici dublu-catenari, complementaritatea se notează cu „plus-minus“ (±), catena „+“ sau catena sens, fiind considerată catena ce conține secvența de baze echivalentă cu ARNm.

În clasificarea lui Baltimore (1996), virusurile animalelor au fost încadrate în 6 clase:

14.1. VIRUSURI CU ADN DUBLU CATENAR

Reprezentanți: adenovirusurile (produc infecții respiratorii), SV_{40}, (simian virus), herpes virusurile, poxvirusurile (*variola* și *vaccinia*).

În cazul acestor virusuri, ADN viral este injectat în nucleu, acolo unde enzimele responsabile de sinteza ARNm celular vor produce ARNm viral. Deoarece din structura sa lipsesc enzimele necesare sintezei ADN viral și ARNm viral, acest tip de virusuri este dependent de aparatul enzimatic al celulei gazdă. Excepție fac poxvirusurile, virusuri foarte mari, care au propriul echipament enzimatic, motiv pentru care se replică în citoplasma celulei gazdă.

14.2. VIRUSURI CU ADN MONOCATENAR

Reprezentanți: *parvovirusurile* (parvos = mic, sărac). Unele parvovirusuri încapsidează ADN mc „-“, care este copiat în celulă sub formă de ADN dc. ADN mc nu poate fi folosit ca atare pentru sinteza ARNm, ci trebuie convertit, în prealabil, în forma dublu catenară. Acesta va fi folosit ca matriță pentru sinteza ARNm. Unele tipuri de *parvovirusuri* încapsidează atât ADN mc „-“, cât și ADN mc „+“, însă în virioni separați, aparținând tipului respectiv, particularitate care face ca genomul lor să fie considerat *„segmentat“*.

14.3. VIRUSURI CU ARN DUBLU CATENAR

Reovirusurile au genomul segmentat, format din 10–12 molecule de ARN dc, fiecare codificând o singură polipeptidă. Catena ARN „-“ este matriță atât pentru sinteza catenei „+“, cât și pentru sinteza ARNm. Virionul conține echipamentul enzimatic necesar pentru sinteza ARNm în citoplasmă sau „in vitro“. Enzimele respective sunt folosite în cercetare pentru obținerea ARNm pur.

14.4. VIRUSURI CU ARN MONOCATENAR PLUS

Deoarece ARN genomic este sinonim cu ARNm, ARN de la nivelul virionului este *infecțios*, prin el însuși. Deci, ARN genomic este folosit atât pentru transcripție, cât și ca matriță pentru producerea de catene „-", care, ulterior, sunt folosite ca matrițe pentru producerea de catene „+", asigurând astfel replicarea virusului. Se cunosc două subclase ale virusurilor cu ARN mc „+". Prima subclasă **IVa** este reprezentată de virusul poliomielitei, la care molecula de ARN a virionului este sinonimă cu molecula ARNm care codifică toate proteinele virale. Inițial se produce o singură polipeptidă uriașă, care apoi este clivată în diferite subunități peptidice funcționale. Cea de a doua subclasă, desemnată **IVb,** este reprezentată de togavirusuri, a căror nucleocapsidă este acoperită de anvelopă. Aceste virusuri produc în celula gazdă cel puțin două tipuri de ARNm. Unul identic cu ARN genomic (ca în cazul virusului poliomielitei), iar celălalt corespunde treimii terminale 3' a ARN genomic. Ambele tipuri de ARNm produc polipeptide care, ulterior, sunt procesate prin clivare. Reprezentanții tipici sunt arbovirusurile, care produc encefalite la om.

14.5. VIRUSURI CU ARN MONOCATENAR MINUS

ARN genomic este complementar cu ARNm, ceea ce înseamnă că nu codifică proteine. Se cunosc două subclase: subclasa **Va** care conține o singură moleculă ARNmc „-" și care se caracterizează prin faptul că virionul prezintă o ARN polimerază ARN-dependentă, care sintetizează molecule de ARNm, folosind ca matriță ARN „-". Fiecare astfel de ARNm codifică pentru o singură proteină. Subclasa **Vb** cuprinde virusuri cu genom segmentat, ca de exemplu, virusul *influenza* (gripal) care prezintă 8 segmente de ARNmc „-", fiecare fiind matriță pentru sinteza unor ARNm diferite, care codifică proteine distincte. Totuși, unele molecule ARNm pot fi transcrise în două cadre de citire diferite. Și aceste virusuri conțin ARN polimeraza-ARN dependentă. În absența acestei polimeraze, care nu este prezentă în celula gazdă, catena de ARN genomic nu *este infecțioasă*. Polimeraza virală folosește oligoribonucleotide specifice celulei în calitate de primeri.

14.6. VIRUSURI CU ARN MONOCATENAR CU CATENĂ SENS (“+“)

Virusuri cu ARN monocatenar cu catenă sens (“+“), care direcționează formarea unei molecule de ADN bicatenar. Reprezentanți: retrovirusurile: *HIV* (*human immunodeficiency virus*), *SIV* (*simian immunodeficiency virus*), *EIAV* (*equine infectious anemia virus*). Caracteristic pentru această clasă de virusuri este prezența în capsida virală a mai multor molecule de reverstranscriptază. Rolul acesteia în replicarea virală este foarte complex. Într-o prima etapă, funcționând ca o ADN-polimerază-ARN dependentă ea catalizează sinteza unei catene ADN „-“, pe baza matriței reprezentate de ARN viral „+“. Se formează, astfel, un duplex ARN „-“ — ADN „+“. În etapa următoare se activează funcția RN-azică a reverstranscriptazei, prin care se asigură degradarea ARN din duplexul ARN-ADN. În același timp, reverstranscriptaza, funcționând ca o ADN polimerază-ADN dependentă, asigură sinteza unui ADN dublu catenar, care se integrează în genomul gazdei. Acesta poate fi transcris de către enzimele gazdei, într-un ARNm ce poate fi implicat în sinteza proteinelor virale, prin cuplarea cu ribozomii gazdei, sau reprezintă ARN viral ce este încapsidat și eliberat din celulă.

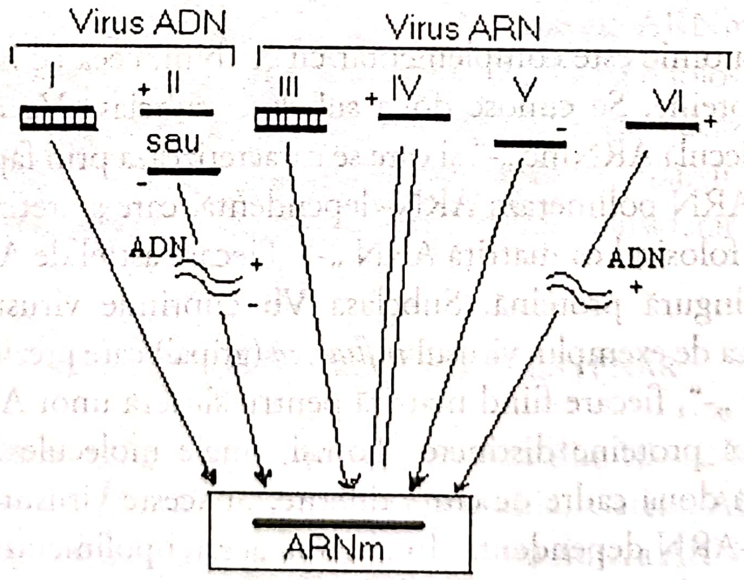


Fig. 10 — Reprezentarea schematică a polarității genomului celor șase clase de virusuri animale și a etapelor sintezei ARNm.

15. REPLICAREA VIRUSURILOR

Mecanismul replicării virusurilor este corelat cu tipul materialului genetic viral (ADN sau ARN, linear sau circular, mono sau dublucatenar).

Prin analiza ciclurilor de replicare virală, s-au caracterizat trei forme în care se poate găsi un virus: virion, virus vegetativ, provirus.

-*virionul* (particula virală matură, completă) este forma de existență a virusului în afara celulei. Această formă are caracter de infecțiozitate.

-*virusul vegetativ* este reprezentat de genomul viral eliberat din capsida virală în mediul intracelular, unde dirijează propria sinteză. Multiplicarea virusului se realizează pe baza componentelor celulei gazdă. Această formă virală are caracter de patogenitate.

-*provirusul* este reprezentat de genomul viral integrat în ADN al celulei gazdă. Această formă apare numai la virusurile lizogene

15.1. REPLICAREA BACTERIOFAGILOR ADN

Bacteriofagii, sau **fagii,** sunt virusuri care se multiplică în bacterii, pe calea ciclului litic sau lizogen.

15.1.1. FAGII LITICI

Multiplicarea virusurilor pe calea ciclului litic nu presupune integrarea genomului viral în cromozomul gazdei și se finalizează cu liza celulei gazdă și eliberarea particulelor virale nou sintetizate.

Replicarea pe calea ciclului litic a fost bine înțeleasă la fagul *φX174* (Fig. 11). Virusul *φx174* are genomul ADN monocatenar, circular, de sens „+“. În timpul infecției, ADN viral este injectat în *E. coli,* unde este replicat rapid de enzimele celulare, producându-se o catenă complementară de sens „-“. Cele două catene ADN, asociate prin punți de hidrogen, realizează o structură „±“ circulară, covalent închisă, superspiralizată, numită formă replicativă parentală (notată RF). Revenirea macromoleculei de ADN la forma bicatenară este o condiție esențială pentru desfășurarea corectă a replicării. Forma replicativă este multiplicată semiconservativ, rezultând astfel mai multe forme replicative. La un moment dat, replicarea simetrică este

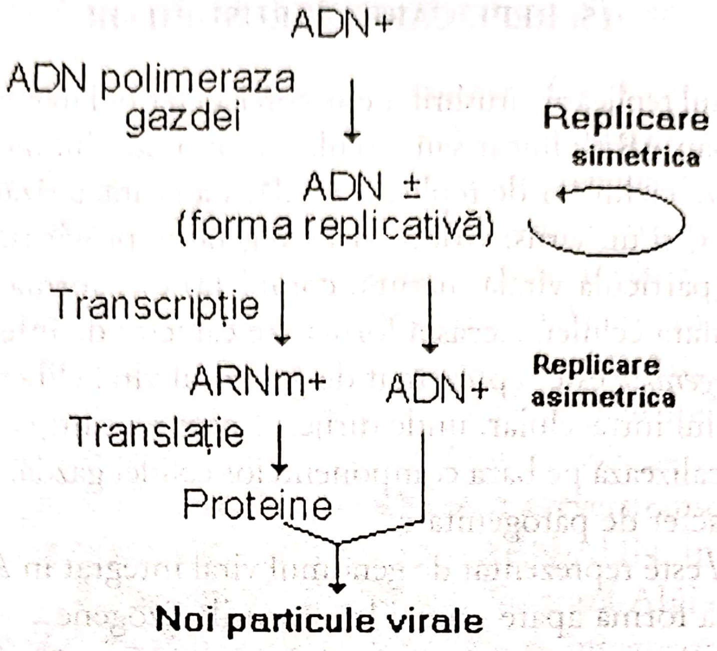

ADN+
ADN polimeraza gazdei
Replicare simetrica
ADN ±
(forma replicativă)
Transcripție
ARNm+
ADN+
Replicare asimetrica
Translație
Proteine
Noi particule virale

Fig. 11 — Ciclul de replicare al bacteriofagului *φX174*

stopată și începe replicarea asimetrică, de această dată doar catena „-" funcționând ca matriță. În paralel cu replicarea asimetrică se realizează și sinteza proteinelor necesare asamblării noilor particule fagice.

Replicarea și asamblarea fagului presupun mecanisme de recunoaștere a unor secvențe specifice de baze azotate (în replicare) și a unor proteine (în procesul de asamblare a noilor particule fagice).

Replicarea după modelul inelului rotativ (*rolling circle*) a fost propusă de către Dressler (1970) ca o alternativă a modelul *Cairns*, propus pentru replicarea cromozomului bacterian circular. Modelul inelului rotativ este întâlnit în conjugarea bacteriană, unde se asigură transferul unor segmente cromozomale de la o celulă donor, la una receptor. Modelul presupune crestarea enzimatică, situs specific a catenei „+", din forma replicativă dublu catenară. Catena „-" rămâne circular covalent închisă și are valoare de matriță. Capătul 5' al catenei „+" se desfășoară și se atașează de membrana celulară, iar capătul 3'-OH liber este utilizat de ADN polimeraza gazdei ca primer pentru alungirea catenei „+". După ce bifurcația de replicare a parcurs cel puțin o dată matrița, o parte din monocatena „+" poate fi copiată de o altă moleculă de ADN polimerază, rezultând o moleculă ADN, parțial dublucatenară. Regiunea dublucatenară formată este separată enzimatic de restul macromoleculei. Complementaritatea secvențelor terminale generate anterior permite circularizarea fragmentului separat, structura circulară covalent închisă fiind refăcută de către o ligază.

ADN fagic dirijează sinteza unor proteine care recunosc cu mare fidelitate catenele „+“, nou sintetizate. Atașarea acestor proteine de catenele „+“ asigură funcționarea ca matrițe doar a catenelor „-“ și generarea de noi catene „+“, care vor fi apoi încapsidate.

Majoritatea bacteriofagilor au particularități ale replicării.

Bacteriofagul T_4 are un ADN monocatenar linear, de 56 μm. După infecție, genomul viral se circularizează și prin mecanismul inelului rotativ se sintetizează concatemeri foarte lungi, care sunt clivați în fragmente cu lungimea corespunzătoare genomului fagic. Astfel, dacă secvența inițială de gene este ABCDEFGHIJ, molecula concatemeră va avea secvența ABCDEFGHIJABCDEFGHIJABCDEFGHIJ. Prin clivarea ei, în segmente de lungime corespunzătoare ADN fagului T_4, rezultă repetiții terminale, permutate circular, de tip ABCDEFGHIJAB, CDEFGHIJABCD, EFGHIJABCDEF, GHIJABCDEFGH ș.a.m.d. Se admite că un mecanism fizic ar interveni în stabilirea lungimii genomului fagului T_4. Ipoteza „capului umplut“, enunțată de J. Sechaud și G. Streisinger, susține că molecula gigantică, concatemeră de ADN fagic, este împachetată în capsida fagică, până când aceasta este umplută la refuz. În acest moment intervine o endonuclează care separă cromozomul fagic încapsidat, de restul moleculei. Endonucleaza nu are specificitate de secvență, ea taie ADN în locul în care acesta nu mai poate pătrunde în capsidă. Noul capăt liber al concatemerului pătrunde într-o altă capsidă ș.a.m.d.

Bacteriofagul T_7 are un genom ADN bicatenar, lung de 11,5μm, care la capete prezintă secvențe repetitive. După injectarea genomului viral în *E. coli*, sunt sintetizate proteinele (aproximativ 30) necesare replicării fagului. Principalele proteine sintetizate sunt o endonuclează, o ligază, o ADN polimerază cu specificitate fagică și o exonuclează, care degradează cromozomul bacterian. Replicarea bacteriofagului T_7 începe prin apariția unui ochi de replicare într-un situs fix, aflat la circa 2 μm de un capăt al dublului helix, care se replică bidirecțional. O nouă rundă de replicare poate fi inițiată înainte de terminarea primei runde, rezultând astfel molecule de ADN cu mai multe bifurcații de replicare.

15.1.2. FAGII LIZOGENI

Fagii lizogeni (temperați) după ce au pătruns în celula gazdă pot urma două căi: calea litică, în care genomul viral funcționează ca un replicon independent și calea lizogenă, care presupune integrarea genomului viral în cromozomul gazdei, sub formă de profag. În calea lizogenă, integrarea virală are loc la scurt timp după pătrunderea în celula gazdă.

Cel mai cunoscut ciclu lizogen este cel al fagului temperat lambda (λ), care infectează specific bacteria *E. coli.* Fagul *λ* are un genom ADN dublucatenar liniar, care, după ce a fost injectat în celula gazdă, se circularizează aproape instantaneu datorită capetelor sale coezive. În acest moment, se poate realiza decizia binară: virusul poate urma calea ciclului litic sau calea ciclului lizogen. În calea litică, genomul viral funcționează ca un replicon independent, se multiplică și sunt asamblate noi particule fagice, care sunt eliberate prin liza celulei gazdă. În calea lizogenă, o regiune lungă de 15 perechi de baze, omoloagă între genomul viral și cel al gazdei, este suficientă pentru realizarea recombinării și integrării virusului. Acest mod de integrare explică de ce profagul ocupă totdeauna același loc în genomul gazdei. O celulă care conține un profag, se numește celulă lizogenă. În aceste celule, profagul este replicat o dată cu genomul gazdei, timp de mai multe generații celulare. Spontan, sau sub acțiunea unor factori fizici (iradiere cu UV) sau chimici, care lezează ADN, are loc inducția profagului, adică excizia sa din cromozomul bacterian. Atât integrarea cât și excizia profagului implică un echipament enzimatic complex, format din: integraze, excizionaze, ligaze, etc. După excizie, ADN viral se circularizează și urmează calea litică.

15.3. CICLURI DE REPLICARE MAI PUȚIN OBIȘNUITE

Unii bacteriofagi au un ciclu de replicare care nu este în totalitate nici litic, dar nici lizogen. Un astfel de exemplu este fagul *M13*, de la *E. coli*, care are genomul monocatenar, circular. După injectarea genomului fagic, în bacterie este sintetizată catena complementară, rezultând forma dublucatenară, care, prin replicări ulterioare, generează aproximativ 100 copii ADN dublu catenare, circulare. În acest stadiu, replicarea are caracteristici de ciclu litic și lizogen. Asemănător fagilor litici, se sintetizează proteinele de înveliș ale fagului M13 și noi particule fagice sunt asamblate și eliberate din celulă. Eliberarea noilor fagi se realizează fără distrugerea celulei gazdă, asemănător fagilor lizogeni, astfel încât celula continuă să crească și să se dividă. Bacteriile rezultate din celula infectată moștenesc copii ale genomului viral, ele continuând producerea de particule virale. Astfel, ciclul de replicare al fagului M13 este parțial litic, parțial lizogen.

16. REPLICAREA VIRUSURILOR ADN LA ANIMALE

În celulele animale replicarea ADN viral are loc după modelul semi-conservativ, fiind dependente de o ADN polimerază ADN dependentă ce utilizează precursorii celulari pentru sinteza componentelor virale. Dependența virusurilor de ADN polimeraza gazdei este diferită: virusurile mici utilizează polimeraza celulară, iar cele mari, complexe, conțin informația pentru sinteza propriei polimeraze. De exemplu, virusul herpes, codifică pentru 7 enzime implicate în replicarea genomului viral, printre care și o ADN polimerază virală.

Adenovirusurile au un genom ADN dublu-catenar, de 20–25kDa, care la capete are secvențe invers repetate, lungi de 100–140 ba. Capetele 5' ale catenelor sunt legate covalent de o proteină de 55kDa.

Adenovirusurile pătrund în celula gazdă prin intermediul unor vezicule de endocitoză, în interiorul cărora începe decapsidarea virusului. Din citoplasmă, genomul viral pătrunde în nucleu, unde începe foarte rapid transcripția unei porțiuni din genomul viral (transcripție timpurie) de către ARN polimeraza II. Replicarea ADN al adenovirusurilor se realizează pe baza unui mecanism de tip inel rotativ modificat, în care îndepărtarea unei monocatene are loc treptat în timpul replicarii (Fig. 12). Catenele virale prezintă la capetele lor proteine (55kDa) care pot funcționa ca primer pentru inițierea replicării virale. Replicarea se realizează pe modele diferite pe cele două catene. Prima catena ADN care se sintetizată, îndepărtează treptat catena de același sens din molecula parentală. Catena îndepărtată, reprezentând un intermediar al primei runde de replicare, este la rândul ei replicată, dar utilizând un alt mecanism. În replicarea acestei catene

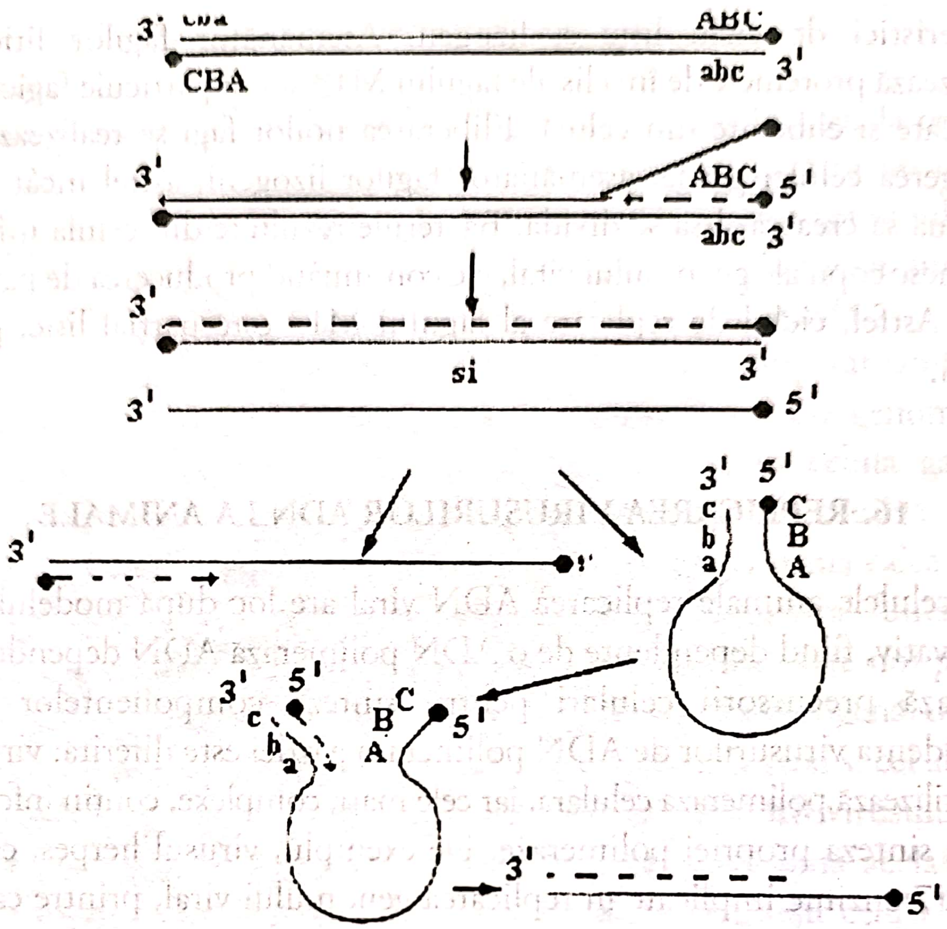


Fig. 12 — Reprezenterea schematică a replicării genomului Adenovirusurilor. Proteina legată de capătul 5' este simbolizată prin „•“, catenele în replicare și cele nou sintetizate prin „- -“, iar cele parentale prin „—“. Literele reprezintă secvențele complementare de la capetele genomului viral. (După Jay A. Levy, 1994).

probabil intervin secvențele complementare de aproximativ 100 nucleotide de la extremitățile moleculei. Indiferent dacă capetele coezive se asociază între ele sau nu, se pare că rolul de primer revine tot proteinei de 55KDa.

Herpes virusurile au genomul ADN dublu catenar, linear, de aproximativ 160Kb, cu două secvențe unice: L (*large*) și S (*short*). La *Virusul Herpes Simplex* (HSV), aceste secvențe sunt orientate întâmplător și sunt flancate de o secvență invers repetată, de 300–400 nucleotide. Într-o populație de virusuri, datorită recombinării aleatorii între secvențele inversate, se găsesc simultan cele patru forme ale genomului linear: P (prototip), IL (inversarea secvenței L), IS (inversarea secvenței S) și ISL (inversarea ambelor secvențe). După pătrunderea ADN viral în nucleul celulei, secvențele terminale invers repetate ale unei catene sunt digerate parțial de o exonuclează, iar catena intactă se circularizează. La replicarea ADN participă mai multe proteine dintre care unele sunt codificate de virus: o ADN polimerază specific virală, o proteină de legare la ADN, o proteină care se leagă la originea replicării, o proteină care se leagă de ADN dublucatenar, trei proteine care se asociază și formează un complex cu activitate primazică și helicazică.

Inițial molecula circulară se replică după modelul semiconservativ iar ulterior, după modelul inelului rotativ. Rezultatul replicării este un concatemer, din care monomerii sunt separați enzimatic, în cursul asamblării particulei virale, într-o manieră asemănătoare procesului de încapsidare a ADN fagic. Capetele monomerilor se unesc pe bază de complementaritate, iar structura circulară covalentă, dublu catenară, este refăcută de o ligază. La procesarea ADN fagic și încapsidarea sa participă diferite proteine codificate de virus. În momentul în care virusul străbate membrana nucleară, se formează anvelopa virală.

Parvovirusurile au un genom ADN monocatenar, linear, de 4,8Kb. ADN viral are terminal secvențe palindromice, care formează bucle în formă de"Y", la ambele capete (Fig 13). Regiunile palindromice terminale reprezintă 5% din genom și sunt esențiale pentru replicare, deoarece au valoare de primer pentru replicarea ADN viral. Regiunile terminale palindromice au fost conservate în evoluția acestor virusuri. Replicarea papovavirusurilor are loc în nucleu, nefiind necesară integrarea sa în genomul gazdei. Virusul utilizează pentru sinteza ADN propriu mașinăria gazdei de sinteză a ADN. Replicarea virusurilor are loc doar în celule care sunt în faza S și mai puțin în cele aflate în faza G2 a ciclului celular, datorită

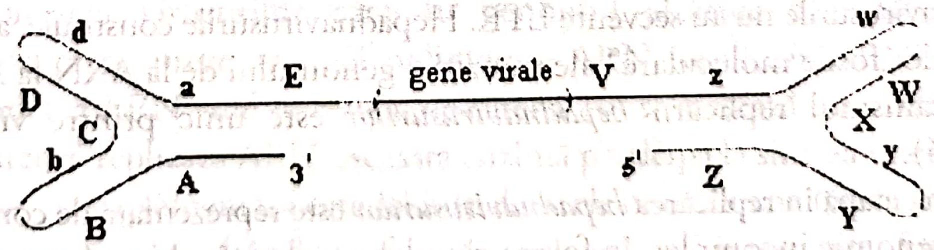


Fig. 13 — Prezentarea schematică a genomului unui parvovirus. Capetele complementare formează bucle în formă de „Y".

dependenței virusului de ADN polimeraza gazdei, care este activă în faza S a ciclului celular. Replicarea ADN viral nu necesită circularizare.

Papovavirusurile au genomul format dintr-o molecula de ADN dublu catenar, circular. Replicarea genomului viral este simetrică, bidirecțională, printr-un mecanism asemănător celui întâlnit la procariote și la organitele eucariotelor (mitocondrii și cloroplaste). Moleculele se despiralizează datorită unei incizii monocatenare, care ulterior este reparată rapid. În acest proces sunt implicate enzime de origine celulară , topoizomeraze, ADN-giraze.

Hepadnavirusurile. Genomul acestor virusuri este alcătuit din ADN circular, parțial monocatenar. Catena întreagă L (lungă), de sens „-“, este circular deschisă și are o lungime de 3200 nucleotide, iar catena complementară, incompletă S (scurtă), are între 1700 — 2800 nucleotide. Cele două catene sunt menținute împreună prin legaturile de hidrogen stabilite între ele. Capătul 5“ al catenei S este localizat la aproximativ 300 nucleotide de discontinuitatea din catena complementară.

La capătul 5' al catenei „-“ este legat un polipeptid de 19 aminoacizi, care funcționează ca primer, iar la capătul 5' al catenei opuse este localizat un primer oligoribonucleotidic.

Evidențierea în timpul replicării hepadnavirusurilor a formelor intermediare ADN monocatenare și dublucatenare, a hibrizilor ADN-ARN și a moleculelor ARN, au condus la concluzia că aceste virusuri se replică printr-un intermediar ARN. Ulterior, s-a arătat că polimeraza virală acționează ca o reverstranscriptază în timpul replicării. Descoperirea acestei enzime a sugerat divergența hepadnavirusurilor din ribovirusuri. Totuși, există diferențe între replicarea retrovirusurilor și a hepadnavirusurilor; astfel hepadnavirusurile împachetează în virion o proteină care va funcționa ca primer pentru replicarea catenei „-“ , în timp ce retrovirusurile împachetează un primer reprezentat de ARNt; spre deosebire de retrovirusuri, hepadnavirusurile nu au secvențe LTR. Hepadnavirusurile constituie, așadar. veritabile „fosile moleculare“ ale tranziției genomului de la ARN la ADN.

Mecanismul replicării *hepadnavirusurilor* este unic printre virusuri (Fig. 14).

Prima etapă în replicarea *hepadnavirusurilor* este reprezentată de conversia ADN genomic incomplet, în forma circular covalent închisă. Acest proces are loc în nucleul hepatocitelor și presupune completarea catenei „+“ de către o ADN polimeraza virală care utilizează ca primer capătul 3' al catenei

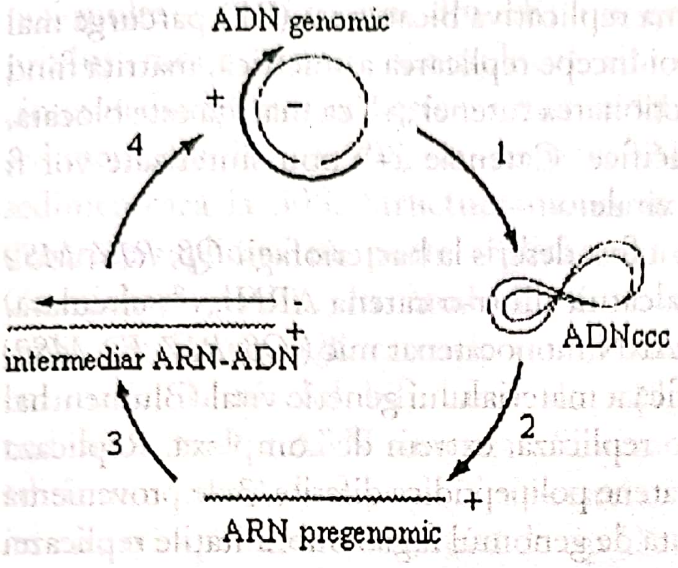


Fig. 14 — Replicarea genomului HBV, prin reverstranscriere
1 ADN asimetric în ADNccc;
2 sinteza progenomului;
3 sinteza catenei ADN „-“ prin reverstranscriere;
4 sinteza catenei complementare. (după Ganem și Varmus, 1987).

scurte și ligarea capetelor ADN. În etapa a doua, ADNccc este transcris, de transcriptaza gazdei, într-o moleculă de ARN, de 3,5Kb, denumită *progenom.* Progenomul este complexat cu proteine în miezul particulei virale. În etapa următoare este sintetizată, prin reverstranscriere, catena ADN „-“, utilizând ca matriță molecula de ARN progenomic. Primerul utilizat în această etapă este unul de natură proteinică. În ultima etapă are loc sinteza catenei ADN de sens „+“ , prin copierea catenei ADN de sens „-“. Pentru sinteza acestei catene este utilizat un primer oligonucleotidic viral. Molecula de ARN pregenomic poate funcționa ca ARNm.

17. REPLICAREA ARN VIRAL

17.1. REPLICAREA ARN FAGIC

Replicarea virusurilor care au genomul alcătuit din ARN, este dependentă de prezența unei polimeraze ARN (replicaza ARN). După pătrunderea ARN viral în celulă, de catena „+“ se atașează ribozomii, care vor sintetiza replicaza ARN. Această enzimă participă la sinteza unei catene ARN „-“, complementară catenei inițiale. Cele două catene (veche și nouă) rămân unite, rezultând o formă replicativă bicatenară; formarea intermediarului dublu-catenar este o condiție esențială chiar și pentru replicarea ribovirusurilor, structurile bicatenare asigurând probabil, o mai mare fidelitate a replicării. Forma replicativă bicatenară (RF) parcurge mai multe runde de replicare, iar apoi începe replicarea asimetrică, matrița fiind reprezentată de catena „-“. Funcționarea catenei „+“ ca matriță este blocată, prin legarea unor proteine specifice. Catenele „+“ nou sintetizate vor fi împachetate în noile particule virale.

Acest mecanism de replicare a fost descris la bacteriofagii *Qβ, R17, MS2* de la *E. coli*, care au genomul alcătuit dintr-o catena ARN „+“, circulară.

Replicarea bacteriofagilor cu ARN monocatenar mic (*Qβ, R17, F2, MS2)* presupune recunoașterea specifică a materialului genetic viral (Blumenthal și Carmichel, 1979), de către o replicază, extrem de complexă. Replicaza fagului *Q*β este compusă din 4 catene polipeptidice diferite, 3 de proveniență celulară, iar a patra este codificată de genomul fagic. Subunitățile replicazei Qβ, împrumutate de la bacterie, sunt: proteina ribozomală S1 (de 70.000 Da) și factorii de elongație EF-Tu (45.000Da) și EF-Ts (35.000 Da). În mod normal, proteina S1 intră în componența subunității 30S a ribozomilor bacterieni, având rol în recunoașterea ARNm celular. În replicaza fagului Qβ, proteina S1 intervine în recunoașterea ARN viral. Rolul factorilor EF-Tu și EF-Ts în replicarea ARN fagic nu a fost stabilit cu certitudine.

Genomul fagului *Qβ* nu conține întreaga informație pentru propria sa replicare (Fig 15). El conține doar genele pentru proteina A, proteina capsidei și pentru subunitatea II a replicazei Qβ. Polipeptidul codificat de fag din structura replicazei are o greutate moleculară de 65.000Da. Catena „-“ a ARN fagic are la capătul 3’ secvența 5’CCACCC3’, care este recunoscută specific de către replicaza Qβ. Această secvență funcționează ca secvență start pentru sinteza catenei complementare. Replicaza recunoaște și secvența complementară secvenței start 5’GGG UGG3“.

+$^{5'}$GGGUGG	Gena pentru Proteina A	Gena pentru proteina de înveliș (capsidă)	Gena pentru subunitatea II a replicazei	CCACCAA$^{3'}$
-$^{3'}$CCCACC	....	....	....	.GGUGGGU$^{5'}$

Fig. 15 — Reprezentarea genomului fagului *Qβ*

Cele patru peptide din structura replicazei Qβ formează două subcomplexe desemnate S1–II și EF-TuTs. Replicaza se leagă la unul sau mai multe situsuri interne din ARN monocatenar și asigură sinteza unui produs monocatenar. Complexul timpuriu de replicare, denumit „intermediar replicativ", este o structură labilă care, în gradient de sucroză, sedimentează la 40–50S, în timp ce ARN fagic care nu se replică, sedimentează la 30S. Structura monocatenară a matriței este necesară, deoarece replicaza nu poate replica vreun duplex ARN (Blumenthal și Carmichael, 1979). În modelul fermoarului *(zipper)*, propus pentru replicarea fagului *Qβ*, catenele intermediarului replicativ sunt separate, enzimatic, la nivelul bifurcației de replicare, de structura secundară, tridimensională a ARN sintetizat. Sinteza catenei „-" este terminată prin adiția unui rest A, la capătul 3' al acestei catene. Mecanismul acestei adiții nu este o împerechere obișnuită de tip U-A, deoarece restul terminal 5' al catenei „+" este pppG.

Catena ARN „+" este folosită atât pentru translație cât și pentru transcripție. Deoarece polimeraza ARN se deplasează pe matriță în direcția 3'-5', iar complexul de translație în direcția 5'-3', între cele două complexe ar putea exista coliziuni. Această situație este evitată prin decalarea celor două procese. Astfel, replicaza inhibă legarea ribozomilor la ARNm, permițând sinteza ARN „-", iar proteinele capsidei sunt represori translaționali specifici pentru gena replicazei.

17.2. REPLICAREA VIRUSURILOR ARN LA ANIMALE.

Replicarea genomului ARN monocatenar se face după următorul model: catena ARN este convertită într-o formă dublu catenară, sub acțiunea unei enzime de replicare virale. Forma replicativă este utilizată pentru sinteza de catene cu aceeași polaritate (secvență de nucleotide) ca și a genomului viral. Sinteza catenelor noi este succesivă și completă, adică sinteza următoarei catene nu începe până când sinteza precedentei catene nu s-a terminat.

La ribovirusuri, de multe ori, procesele de replicare și transcriere interferă, datorită faptului că ARN genomic funcționează alternativ ca matriță pentru replicare și pentru transcriere.

La virusurile cu genom ARN „+" (*Picorna* și *Toga*), catena „+" a formei dublu catenare este îndepărtată de catena nascentă a intermediarului de replicare. Catenele „+" vor îndeplini rolul de ARN_m și vor fi traduse în proteine virale, sau vor funcționa ca matrițe pentru sinteza unor noi catene de sens „-“. La rândul lor, catenele „-“ funcționează ca matrițe pentru sinteza altor catene ARN „+“, amplificându-se astfel rata de multiplicare a particulelor virale.

Replicarea virusurilor cu genom ARN „+“ este dependentă de capacitatea ARN genomic de a funcționa ca ARNm. Acest fapt are două consecințe:

1. enzimele necesare replicării virale sunt sintetizate în celulă pe baza ARNm viral, nefiind necesară prezența lor în virion. În consecință, dimensiunile virusului pot fi mai reduse și ARN genomic este infecțios;
2. genomul viral fiind monopartit, produsul transcrierii este o poliproteină, care ulterior este clivată în proteine virale funcționale.

Virusurile cu genom ARN „-“ (*Paramyxovirus*) formează un intermediar de replicare dublucatenar care funcționează alternativ ca matriță pentru transcrierea ARN$_m$ monocistronic și pentru sinteza ARN „-“, cu rol de material genetic. Virionul trebuie să aducă în celulă o transcriptază proprie (ARN-polimerază ARN-dependentă) pentru sinteza de ARN$_m$. ARN purificat al acestor virusuri nu este infecțios, el neputându-se multiplica în absența propriei transcriptaze. Replicarea virusurilor cu genom ARN“-“ are loc în citoplasmă, excepție fac *Orthomyxovirusurile* care au o etapă nucleară. La *Orthomyxovirusuri*, în transcrierea catenelor cu rol de ARNm și a celor genomice intervin aceleași enzime virale. Ulterior, ARNm viral este metilat și poliadenilat de enzime celulare nucleare și transferat în citoplasmă. Catenele ARN „+“ care rămân în nucleu au rol de matriță pentru sinteza ARN genomic, pe toată durata procesului infecțios.

Replicarea virusurilor cu genom ARN dublu-catenar multipartit (*Reovirusuri)*, este simultană cu transcrierea. Primele etape ale ciclul de replicare al reovirusurilor presupun pătrunderea virusurilor în celulă, decapsidarea, proces la care participă și lizozomii, și eliberarea miezului particulei virale în citoplasmă.

Transcrierea *Reovirusurilor* utilizează catenele genomice de sens „-“, într-un ARNm. ARN genomic dublucatenar nu poate funcționa ca atare ca ARNm. Se presupune că transcripția are loc pe fiecare moleculă a genomului multipartit, deoarece, cu ajutorul microscopului electronic, au fost evidențiate cel puțin nouă molecule de ARNm. Sinteza ARN are loc în echivalentul miezului viral, denumit particulă subvirală, care rămâne intactă în celulă (Fig 16).

Transcripția ARNm este realizată de o polimerază proprie virionului, care conservă moleculele de ARN genomic. Moleculele de ARNm nou sintetizate sunt procesate (bonetate, metilate la nivelul unor situsuri specifice) și eliberate în citoplasmă. ARNm viral este tradus în proteine virale, care participă ulterior la asamblarea noilor particule virale.

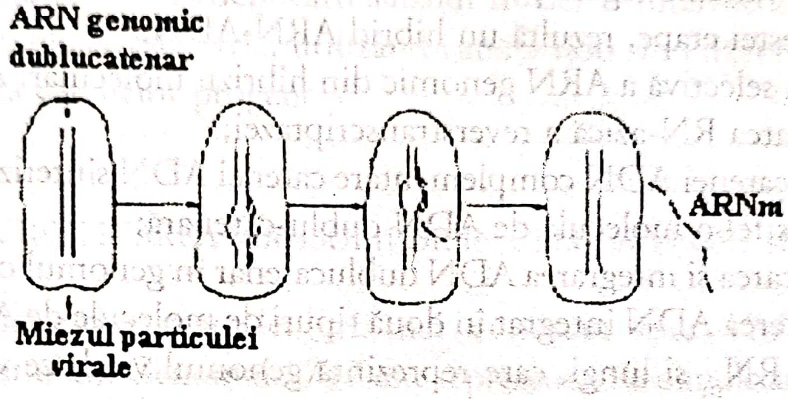


Fig. 16 — Transcripția conservativă a genomului reovirusurilor, proces care are loc în citoplasmă, în interiorul miezului particulelor virale. (După Jay A. Levy, 1994).

Moleculele de ARN_m nou sintetizate au două funcții:
- conțin mesajul pentru sinteza proteinelor virale
- se asociază cu o precapsidă, alcătuită din proteine virale sintetizate anterior și servesc ca matrițe pentru sinteza catenelor complementare.

Nu este cunoscut mecanismul prin care are loc încapsidarea specifică a moleculelor de ARN, ce alcătuiesc genomul viral segmentat, dar se presupune că are loc la nivel monocatenar și implică o recunoaștere specifică ADN-proteine.

Retrovirusurile au un genom ARN, care se replică printr-un intermediar ADN. În fiecare virion, informația genetică este înscrisă în două catene ARN identice, astfel că aceste retrovirusuri sunt diploide. Mecanismul prin care cele două molecule identice de ARN genomic sunt asociate în timpul asamblării virusului este necunoscut. În timpul replicării ARN viral este utilizat ca matriță pentru sinteza unei copii ADN a genomului viral. Deoarece celula gazdă nu are enzime ADN-polimeraze ARN-dependente, virionul trebuie să aducă această enzimă, precum și o moleculă de ARN_t.

cu rol de primer, pentru inițierea procesului de reverstranscriere. Reverstranscriptaza virală este sintetizată de celula gazdă pe baza informației genetice virale și împreună cu ARNt au fost încorporate de virus în timpul încapsidării.

Etapele replicării genomului retroviral sunt următoarele:

-legarea complexului molecular ARN$_{t}$-RT de ARN genomic;

-sinteza unei copii de ADN complementar, catalizată de reverstranscriptază și care rămâne legată prin punți de hidrogen de ARN genomic. La sfârșitul acestei etape, rezultă un hibrid ARN-ADN;

-digestia selectivă a ARN genomic din hibrizii moleculari ADN-ARN, prin activitatea RN-azică a reverstranscriptazei;

-sinteza catenei ADN complementare catenei ADN sintetizate anterior, rezultând astfel o moleculă de ADN dublu-catenară;

-translocarea și integrarea ADN dublucatenar în genomul celulei gazdă;

-transcrierea ADN integrat în două tipuri de molecule de ARN: scurte, cu rol de ARN$_{m}$ și lungi, care reprezintă genomul viral, ce va fi ulterior încapsidat.

Transcriptaza virală are cel puțin trei activități: sintetizează o catenă ADN complementară ARN viral, activitatea ribonucleazică (ribonucleaza H) și sintetizează catena complementară copiei ADN a genomului viral. Activitatea RN-azică este necesară îndepărtării ARN genomic din hibridul ARN-ADN, pe măsura sintezei celei de a doua catene polideoxiribonucleotidice. Activitatea polimerazică a reverstranscriptazei (RT) necesită o matriță ARN sau ADN și asemenea tuturor ADN-polimerazelor, nu

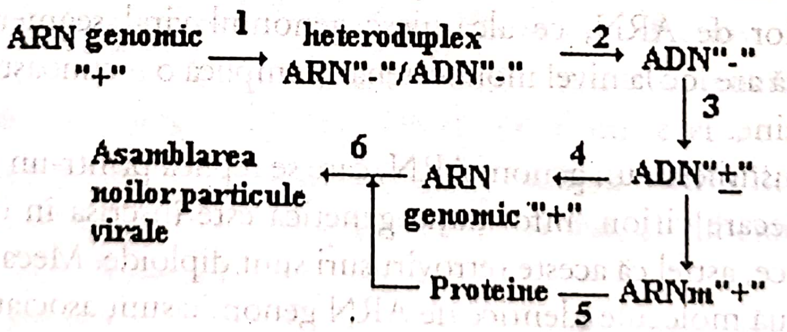


Fig. 17 — Etapele principale ale replicării retrovirusurilor; 1 reverstranscrierea ARN genomic viral; 2 degradarea ARN din heteroduplexul ARN/ADN; 3 sinteza catenei genomice ADN complementare; 4 sinteza ARN genomic viral; 5 sinteza proteinelor virale; 6 asamblarea noilor particule virale.

inițiază sinteza ADN de novo. „In vitro", primerul poate fi reprezentat de oligonucleotide ARN sau ADN, dar „in vivo", primerul este reprezentat de un fragment de ARN. Pentru sinteza catenei ADN de sens „-", rol de primer îl are ARN_t. Activitatea polimerazică a tuturor reverstranscriptazelor este dependentă de prezența cationilor bivalenți (ex. Mg^{2+}, 10mM).

Necesitatea conversiei formelor monocatenare de acid nucleic virional (fie ARN, fie ADN), în forme replicative bicatenare în interiorul celulei este o trăsătură generală a replicării acizilor nucleici. Intermediarul dublu catenar este replicat asimetric, utilizând catena nou sintetizată ca matriță pentru sinteza catenelor progene.

17.3. REPLICAREA VIRUSURILOR ÎN CELULA VEGETALĂ

Dintre virusurile vegetale, cel mai cunoscut este *VMT* (virusul mozaicul tutunului). Genomul *VMT* este reprezentat de o moleculă de ARN monocatenar „+" care este replicat de o ARN polimerază proprie. Acest virus codifică sinteza a patru proteine virale, dintre care una este proteina capsidei. Cu toate că ARN viral este „+" și poate funcționa ca ARNm, sinteza proteinică este complexă. Proteina de înveliș este sintetizată pe baza unui ARNm care are aceiași secvență ca și capătul 3' al genomului VMT. După replicarea genomului viral și sinteza proteinelor de înveliș, ele se asamblează spontan, formând virionul complet. Protomerele capsidale formează discuri care prin suprapunere formează structuri capsidale helicale. Asamblarea proteinei de înveliș cu ARN viral începe la nivelul unui situs localizat lângă capătul 3' al moleculei genomice și continuă în direcția opusă, prin adiția protomerelor. În interiorul capsidei, ARN viral are un traseu în spirală.

18. VIRUSURILE ȘI TRANSFORMAREA MALIGNĂ

Tumorile (neoplasmele) sunt porțiuni de țesut modificat, formate prin multiplicarea unui grup de celule, din cadrul unui țesut în care celule nemodificate, normale, nu se divid. Când structura celulară a tumorii este suficient de dezorganizată, încât să permită detașarea și migrarea la distanță a celulelor modificate (metastazare), neoplasmul este denumit *malign*. Procesul prin care o celulă normală este convertită în celulă malignă, se numește *transformare malignă*.

Malignizarea este un proces multistadial, care presupune parcurgerea următoarelor etape: inițiere, promoție și progresie. Parcurgerea acestor etape este obligatorie pentru un proces de malignizare complet. În timpul acestor etape, celulele acumulează mutații, fenotipul celular se schimbă, iar celulele modificate, care prezintă avantaje selective, se multiplică (ex. independența față de factorii de creștere) și vor da naștere unei populații maligne. Materialul genetic alterat în timpul malignizării este moștenit în succesiunea generațiilor celulare, cancerul fiind în esență datorat unor mutații genetice somatice.

Malignizarea este asociată cu modificarea fenotipului de creștere, imortalizare, alterarea mecanismelor de control al ciclului celular, mai ales al celui de trecere de la G1 la S. Celulele transformate se deosebesc de cele normale prin:

- suprafața celulară (modificarea glicolipidelor și glicoproteinelor, pierderea joncțiunilor strânse, expresia antigenelor fetale, creșterea secreției de proteaze)
- modificarea citoscheletului, a moleculelor semnal (ex. nucleotide ciclice) etc.
- condițiile de creștere (densitatea de saturare crescută sau nedefinită, absența inhibiție de contact, reducerea dependenței față de factori de creștere); celulele modificate injectate în animale putând forma tumori.

Celulele normale conțin în genomul lor reglatori pozitivi (protooncogene) și negativi (gene supresoare ale creșterii tumorale — *GSCT*) ai proliferării celulare. Transformarea celulară se poate realiza prin cel puțin două procese: supraexpresia protooncogenelor, care în acest caz se comportă ca oncogene și prin inactivarea *GSCT* (ex. p53, Rb). Rolul *GSCT* și al protooncogenelor în malignizare a fost evidențiat in vivo și in vitro. Aceste gene pot fi modificate prin interacția celulă — virus. Transformarea celulară este condiționată de persistența intracelulară integrală sau parțială a genomului viral sau de exprimarea continuă a unui număr limitat de gene virale. În genomul unor virusuri au fost descrise oncogene asemănătoare protooncogenelor celulare. În general, virusurile ADN nu conțin protooncogene, ele intervenind în transformarea malignă prin modificarea funcției *GSCT* celulare.

Inducerea transformării maligne de către virusuri presupune:

-integrarea și replicarea stabilă a virusului în genomul gazdei, astfel încât descendenții acestei celule să moștenească și informația genetică virală;

-prezența oncogenelor, sau

-integrarea virusului (mai ales dacă acesta nu conține oncogene) prin care este influențată exprimarea genelor ce cotrolează ciclul celular.

Cele mai cunoscute virusuri care pot induce cancere sunt *Oncornavirusuri*, *Oncodnavirusuri* și familia *Retroviridae*.

19. VIRUSURILE ANIMALE ȘI CANCERUL

Familiile de virusuri ADN ale animalelor conțin membri capabili să inducă tumori maligne sau benigne în unele gazde, cel puțin în condiții de laborator. Genele virusurilor ADN, implicate în malignizare, nu sunt omoloage cu genele gazdei, iar proteinele codificate de aceste gene sunt, în general, localizate nuclear. În mod normal, replicarea acestor virusuri este parțial dependentă de produșii celulei gazdă și conduc la liza celulară și eliberarea noilor particule virale. Transformarea malignă indusă de virusurile ADN poate avea loc doar atunci când infecția nu este urmată de liza celulei gazdă.

Cele mai cunoscute virusuri ADN oncogene sunt: *virusul hepatitei B*, SV_{40}, *virusul polioma*, *virusul papiloma*, *adenovirusuri*, *herpesvirusurile* și *poxvirusurile*.

20. VIRUSURILE HEPATITEI B

Hepadnavirusurile au genomul ADN de aproximativ 3Kb, care nu conține oncogene. Asemenea virusuri au fost izolate de la mai multe specii: rațe, veverițe, ciocănitori și om. Virusurile din această familie au în comun tropismul pentru celulele hepatice și capacitatea de a induce tumori maligne.

Infecția cu virusul hepatitei B la om se realizează pe cale percutană, contact intim (mai ales sexual), perinatală și mai rar pe cale orală, fiind afectați mai ales tinerii, sugarii, copiii mici. Perioada de incubație a virusului este de 0–180 zile, cu o medie de 60–90 zile, iar debutul poate fi insidios, acut, ocazional sever, fulminant (în 0,1–1% dintre cazuri), cu tendință de cronicizare la adulți (1–10% dintre cazuri) și nou născuți (90% dintre cazuri) (Harrison, 1999). Infecția cu virusul hepatitei B se asociază cu dezvoltarea carcinomului hepatocelular, mai ales dacă infecția a fost perinatală. Mecanismul molecular prin care acest virus induce malignizarea nu este deplin înțeles. Gena virală „*x*“ are efecte pleiotrope și se presupune că este implicată în malignizare. Presupunerea se bazează pe nivelul de exprimare ridicat și pe observațiile efectuate pe șoarecii transgenici care exprimă proteina virală. Proteina „X“ este un stimulator transcripțional pentru genele gazdei, inclusiv protooncogene celulare care, în aceste condiții, se comportă ca oncogene și contribuie la declanșarea proceselor maligne. În unele cazuri, malignizarea poate fi declanșată prin inserarea genomului viral în genele supresoare ale creșterii tumorale.

21. SIMIAN VIRUS 40 (SV_{40}) ȘI VIRUSUL POLIOMA

Virusul *SV40* a fost izolat de la maimuțe și are un puternic caracter oncogen. Virusul *Polioma* este frecvent întâlnit la șoarecii sălbatici.

Genomurile SV_{40} și *Polioma* pot fi împărțite, pe baza momentului când sunt traduse, într-o regiune timpurie și una târzie. Regiunea timpurie codifică proteine cu rol în sinteza ADN viral, iar regiunea târzie se exprimă după ce ADN viral s-a sintetizat și codifică pentru proteine structurale. Regiunea timpurie a lui SV_{40} codifică pentru antigenul t mic, de 16kDa și pentru antigenul T mare, de 94 KDa. Antigenul T mare este suficient pentru a induce transformarea celulară, prin legarea de proteinele celulare p53 și Rb.

Mașinăria de replicare și sinteză proteinică a celulei gazdă este deturnată de virus pentru asigurarea propriei multiplicări, proces care continuă până când celula gazdă este lizată și noii virioni sunt eliberați. Foarte rar, virusul SV_{40} se poate integra în genomul gazdei, genele virale acționând în acest caz ca oncogene, care nu au corespondent celular.

La virusul polioma, regiunea timpurie codifică, pe lângă antigenele t mic și T mare, și antigenul t mijlociu. Procesul de transformare celulară este realizat de antigenul T mijlociu, deși nu este exclusă nici colaborarea între antigenii T mijlociu și T mare. Antigenul t mic nu este necesar transformării maligne, produsă de cele două virusuri, deși el ajută la exprimarea fenotipului malign.

SV_{40} și *virusul Polioma* nu induc tumori în gazdele lor naturale (șoareci- pentru *polioma* și maimuțe- pentru SV_{40}). În mod normal, consecința infecției gazdelor naturale este multiplicarea virusurilor și eliberarea lor prin liza celulelor gazdă fără transformarea acestora. Potențialul lor de transformare este evidențiat în condiții de laborator, la specii nepermisive (celule de hamster pentru polioma și de șoarece pentru SV_{40}) în care replicarea virala este blocată. Chiar și în aceste condiții, procesul de transformare este un eveniment rar.

22. VIRUSURILE PAPILOMA

Genomul viral are aproximativ 8 Kb. Virusul *Papiloma* poate induce neoplasme la diferite specii de animale, inclusiv la om. *Virusul Papiloma uman* (*HPV*) are tropism epitelial. *HPV* poate induce condiloame, papiloame și cancere cervicale, în total fiind responsabile de aproximativ 10% din cancerele umane. În cancerele cervicale invazive au fost detectate frecvent *HPV16* și *18*. Genele precoce E6/E7 ale *HPV* sunt răspunzătoare de transformarea celulară. Produșii acestor gene au fost identificați în tumori și liniile celulare tumorale derivate din ele. S-a arătat că E7 interacționează cu gena Rb, iar E6 stimulează degradarea proteinei p53.

La om, au fost descoperite mai mult de 60 de tipuri de virusuri papiloma. Tipurile 1, *2, 4* și *7* provoacă veruci vulvare tipice, sesile, în formă de dom, cu un diametru de aproximativ 1 cm și cu suprafață alcătuită din numeroase proiecții mici, filamentoase. Aceste virusuri mai provoacă veruci plantare tipice, acoperite de keratină groasă și veruci filiforme localizate, mai ales, pe față și gât. *HPV* de tip 3 și 10 sunt asociate mai ales cu veruci plane, care sunt doar puțin proeminente și au o suprafață catifelată, cu tropism pentru față, brațe și picioare.

HPV 6, 11, 16, 18, 31–35, 39, 48 și 51–54 provoacă leziuni ale tractului genital. Tipurile 6 și 11 sunt asociate cu leziuni de tip *condiloma acuminata*, care debutează sub forma unor mici papiloame, care apoi se extind. Virusul afectează la femei labiile, perineul, pielea perianală și uneori mucoasa vaginală, uretra și anusul, iar la bărbați, teaca penisului, scrotul, pielea perianală sau uretră. Leziunile inițiale, moi, roz, filiforme, cresc și se pot uni sub forma unor agregate mari. Unele dintre ele induc doar neoplasme benigne (ex. negi), iar altele pot produce carcinoame cervicale și cancere anogenitale.

La pacienții imunosupresați, după transplant renal și la cei cu epidermodisplazie veruciformă, apar carcinoame spinocelulare asociate cu *HPV 5, 8, 14*. Acești pacienți dezvoltă carcinoame spinocelulare multiple, la nivelul regiunilor expuse la soare.

23. ADENOVIRUSURILE

Adenovirusurile umane sunt virusuri neanvelopate, icosaedrice, de 70–80 nm, care se pot multiplica pe calea ciclului litic sau lizogen. Genomul viral este ADN dublu catenar, liniar, de 36–38 Kb. Pe baza omologiei genomului *Adenovirusurile* se clasifică în 6–7 subgrupe. *Adenovirusurile* umane aparțin genului *Mastadenovirus*, în care sunt incluse 47 serotipuri. *Adenovirusurile* umane în mod normal sunt eliberate prin liza celulei-gazdă naturală. Experimental, s-a constatat că injectarea adenovirusurile la gazde nepermisive (hamster, șoarece) este urmată de apariția unor cancere. Pe baza potențialului de transformare al celulelor animale, adenovirusurile se împart în: grupurile A, B și C. În grupul A, sunt incluse virusuri puternic oncogene, în grupul B, cele intermediar oncogene, iar în grupul C, cele neonocogene.

Până în prezent, studiile efectuate nu au reușit să evidențieze o asociere între adenovirusuri și tumorile umane. În transformare se consideră a fi implicate genele *E1A* și *E1B* (de 55 kb), localizate în regiunea timpurie a genomului. Produșii acestor gene activează transcripția celulară și virală și probabil interacționează specific cu proteinele celulare: *E1A* cu *Rb* și *E1B* cu *p53*.

24. HERPESVIRUSURILE

Herpesvirusurile sunt virusuri complexe ale animalelor, care au genomul de 100–200 Kb. Membrii acestei familii pot induce tumori în gazdele lor naturale.

Virusul Epstein Barr (VEB) este un herpes virus uman, cu tropism pentru limfocitele B. *VEB* are genomul ADN dublu catenar care codifică mai mult de 30 polipeptide. Genele virale *LMP1* pot transforma fibroblastele și modifică creșterea celulelor limfoide. Capsida icosaedrică este înconjurată de un înveliș complex, pe baza căruia se poate identifica cu precizie virusul. Pe baza antigenilor nucleari *VEB* a fost separat în tipul A și B. Tipul B are o capacitate mai redusă de modificare a limfocitelor B, comparativ cu tipul A.

VEB este răspândit pe tot globul și poate fi transmis prin salivă și mai rar prin transfuzii. Infecția primară cu *VEB* are loc, în general, în copilărie și este subclinică. Între 20–70% dintre persoanele care au avut o infecție primară cu *VEB*, dezvoltă un sindrom clinic de mononucleoză infecțioasă, caracterizată prin febră, limfadenopatie și faringită. Virusul este, de asemenea, corelat cu apariția limfoamelor cu celule B și carcinom nazofaringian și cu limfomul Burkitt african. Secvențe ale ADN viral s-au evidențiat în tumori, la 90% din pacienții cu limfom Burkitt. Limfomul american Burkitt, care afectează de obicei copiii mai mari și se prezintă ca o tumoră intra-abdominală, este asociat cu *VEB,* doar în 15% dintre cazuri. În aproape toate cazurile investigate pentru carcinom nazofaringian anaplastic, din Sud-Estul Chinei, a fost identificat *VEB* (Harrison, 1999).

25. VIRUSURILE POX

Poxvirusurile umane sunt virusuri paralelipipedice, ce au genomul de aproximativ 200Kb. Spre deosebire de celelalte virusuri ADN, care se replică în nucleu, poxvirusurile se replică în citoplasmă celulei infectate. Aceste virusuri determină apariția erupțiilor cutanate veziculare caracteristice și pot produce variola, vaccinia, tumori benigne, dar nu și tumori maligne.

26. RETROVIRUSURILE

Retrovirusurile au fost descrise la începutul secolului ca agenți filtrabili care pot produce tumori la pui (Virusul **Sarcomului Rous-VSR**). În anul 1950, a fost identificat la un șoarece cu leucemie, primul retrovirus la mamifere, iar în 1978, primul retrovirus uman *HTLV-1*. În prezent, există patru categorii de retrovirusuri umane patogene, împărțite în două grupe: retrovirusurile leucemice ale celulelor T umane (*HTLV-I* și *HTLV-II*) și virusurile imunodeficienței umane (*HIV-1 și HIV-2*). Retrovirusurile provoacă cancere mai frecvent la animale decât la om. La om, cancerele pot fi induse de: *HTLV1* — leucemia celulelor T, *HTLV2* și *HIV*. Printre retrovirusurile asociate cu maladii maligne se numără virusuri simiene (*STLV-1*), *virusul leucemiei felinelor* (*LeLV*), *virusul leucemiei bovinelor* (*BLV*), *virusul leucemiei gibonului* (*GaLV*) și virusuri aviare și murine. Aceste virusuri pot induce și afecțiuni nonmaligne, cum este cazul *FeLV* ce produce, la pisici, leucemia cu celule T și o imunodeficiență similară cu SIDA.

Mecanismele moleculare prin care virusurile induc transformarea celulară sunt directe și indirecte. Mecanismul direct presupune integrarea genomului viral, preluarea și transformarea protooncogenelor celulare în oncogene (retrovirusuri oncogene transductive) sau activarea protooncogenelor celulare de către promotorii virali puternici. Mecanismul indirect presupune supresarea supravegherii imune și astfel celulele care suferă mutații pot parcurge celelalte etape ale transformării maligne. Spre exemplu, virusul *HIV-1* poate determina pasiv apariția limfoamelor cu celule B și a sindromului Kaposi, prin reducerea eficientei sistemului imun.

Mecanisme de inducere a transformării maligne

Protooncogenele sunt gene celulare normale, care codifică factori de control, reglatori pozitivi ai ciclului celular. Protooncogenele pot fi preluate de virusurile transductive ca urmare a unor rearanjamente genetice, aparent accidentale. După ce au fost preluate, datorită unor mutații (calitative) sau a vecinătății cu promotorii virali puternici, protooncogenele devin mai active și se comportă asemenea oncogenelor. Virusurile care pot integra în genomul lor gene ale gazdei se numesc *virusuri transductoare*. Multe oncogene virale derivă din protooncogenele celulare. Una din primele dovezi ale originii celulare a oncogenelor virale a fost furnizată de analiza comparativă a protooncogenei *c-src* (gena celulară normală) și a oncogenei *v-src* (prezentă în genomul viral). Prin hibridarea materialului genetic de la pui cu gena *v-src* s-a observat că:

- gena *c-src* ocupă același locus în genomul puilor;

- gena *c-src* de la pui este mai mare decât gena *v-src*
- doar gena *c-src* conține introni;
- cele două gene au regiuni complementare, ce corespund exonilor genei *c-src*

Aceste observații au dus la concluzia că gena *v-src* provine din gena *c-src*, ea fiind preluată accidental de *VSR*. Descoperirea originii celulare a oncogenelor stă la baza teoriei originii virale a cancerului. Oncogenele virale sunt mult mai active, comparativ cu protooncogenele din care s-au format. Implicarea oncogenelor virale în transformarea celulară se realizează prin mecanisme de supradozaj genic, mecanisme care presupun că oncogenele virale sunt transcrise la un nivel foarte înalt în celula gazdă. S-a observat că oncogenele transduse de virusuri sunt cei mai eficienți agenți de transformare malignă.

În general, un virus transduce o singură oncogenă. Materialul genetic achiziționat de retrovirusuri înlocuiește total sau parțial genele virale *gag*, *pol*, *env*, astfel încât virusurile modificate sunt defective. La aceste virusuri se pot realiza toate etapele multiplicării virale, cu excepția celei de asamblare a virusurilor progene. Pentru multiplicarea virusurilor defective este necesară cooperarea intracelulară cu un virus *helper* (retrovirus nemodificat), care să asigure informația echivalentă regiunii deletate din genomul virusului transductant.

Transformarea celulară poate fi consecința *inserării genomului viral în genomul gazdei*. Acest mecanism este comun pentru virusurile care nu conțin oncogene. Modelul presupune inserarea virusului în vecinătatea genelor reglatoare ale ciclului celular. Dacă inserarea virusului are loc la maxim 10 Kb de o protooncogenă, promotorii virali puternici asigură transcripția la nivel ridicat a genei. Protooncogena, deși are o structură normală, se comportă funcțional asemănător oncogenelor. De exemplu, la șoareci, cancerul mamar poate fi declanșat prin inserția virusului *MMTV* în gena *wnt-1*, în 19 situsuri diferite.

Unele virusuri tumorale ADN au oncogene proprii, fără corespondent celular, ce codifică pentru produșii specifici virusurilor. Virusurile ADN oncogene interacționează cu celula gazdă în două moduri:

- în celulele permisive, reprezentate de gazdele naturale ale virusurilor, are loc o infecție productivă, virusurile progene fiind eliberate prin liza celulei;

- în celulele nepermisive, reprezentate de celule care nu sunt gazde naturale ale replicării virusului, acesta determină o infecție abortivă (fără consecințe detectabile), sau modifică fenotipul gazdei.

Pentru a modifica fenotipul gazdei, replicarea virală trebuie să fie blocată. Multiplicarea virusurilor ADN nu necesită integrarea genomului viral în genomul gazdei. Absența unor mecanisme de integrare specifice în genomul gazdei, reduc șansele oncogenelor virale de a rămâne active și permanent asociate gazdei. Astfel, șansele transformării și menținerii fenotipului malign prin intermediul virusurilor ADN, sunt foarte reduse.

Virusurile pot induce și în mod indirect malignizarea. Mecanismul a fost descris la *HIV*, care induce gazdei starea de imunodeficiență. Sistemele de apărare ale gazdei, ineficiente în eliminarea celulelor modificate, permit transformarea celulelor fără ca acestea să fie eliminate. Cel mai frecvent, la acești pacienți, apare sindromul Kaposi, care este o tumoră de origine endotelială, indusă de factori de creștere eliberați din celulele infectate cu *HIV*. Un alt mecanism, prin care aceste virusuri pot induce malignizarea, este reprezentat de eliberarea virusurilor *Epstein-Barr like*, cantonați la nivelul sistemul imun (ganglionii limfatici) al indivizilor afectați.

27. VIRUSUL IMUNODEFICIENȚEI UMANE

Genul *Lentivirus*, care după clasificarea lui Baltimore (1996) aparține clasei VI de virusuri, conține retrovirusuri, reprezentate de *HIV (human immunodeficiency virus), SIV (simian immunodeficiency virus), EIAV (equine infectious anemia virus).* Caracteristicile acestui gen sunt: prezența anvelopei, capsida de formă conică, genomul viral alcătuit din două catene ARN, prezența reverstranscriptazei în interiorul capsidei.

Virusul *HIV*

Human immunodeficiency virus (*HIV*) (Fig 18) este un virus ARN care are diametrul extern de aproximativ 1000Å. Genomul viral este alcătuit din două catene ARN (este diploid). Specificitatea de gazdă a virusului este limitată la celulele T helper (care au receptori CD_4) și, în unele cazuri, la celule din creier.

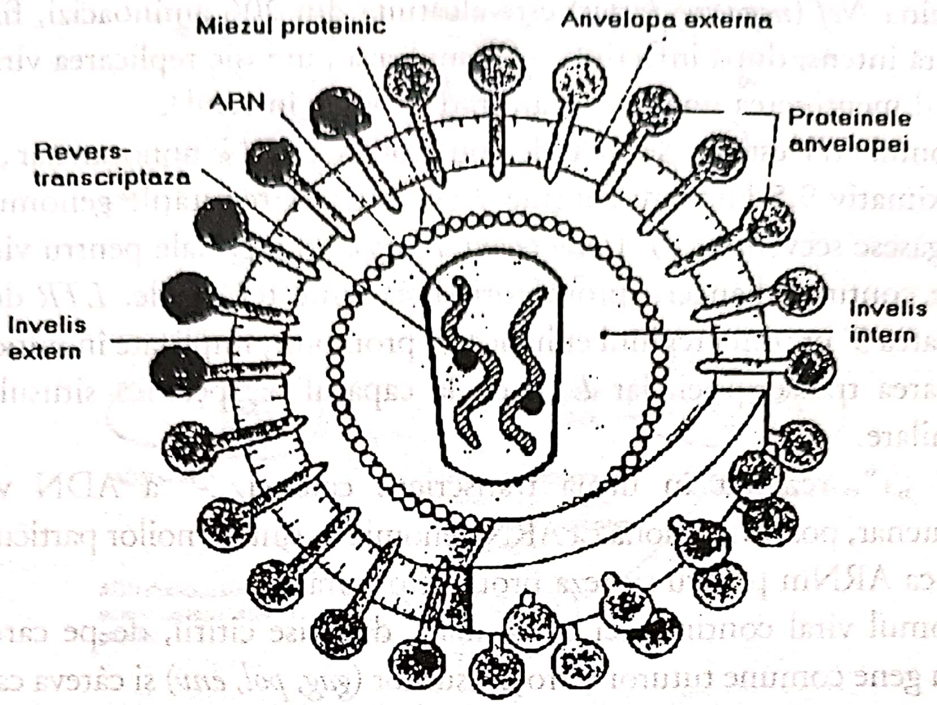


Fig. 18 — Reprezentarea schematizată a structurii virusului *HIV*. (După Kathleen Talaro, 1993).

Anvelopa virală este reprezentată de un bistrat lipidic, în care sunt inserate molecule de glicoproteină *gp120*, cu rol în aderarea virusului la receptorii celulari CD_4. Glicoproteina *gp120* este ancorată de virus prin glicoproteina *gp41*. Pe suprafața anvelopei se mai găsesc, pe lângă proteinele virale specifice, și proteine de pe suprafața membranei celulare: antigene majore de histocompatibilitate, actina, ubiquitina.

Matrixul viral, reprezintă spațiul dintre anvelopă și capsida virală, spațiu care conține aproximativ 2000 molecule de proteină *p17*.

Capsida virală este alcătuită din aproximativ 2000 de molecule proteinice de *p24*. În capsidă sunt incluse două copii separate ale genomului viral, stabilizate de ribonucleoproteine (*p7*), proteine și molecule de ARNt. Moleculele de ARNt au fost preluate din celula gazdă, în momentul încapsidării, și ele sunt utilizate ca primeri pentru replicarea virală. Dintre aceste proteine, unele sunt esențiale virusului (proteaza, reverstranscriptaza, integraza), iar altele sunt proteine accesorii (*Nef*, *Vif* și *Vpr*).

Proteinele *Vpr* și *Vif* au structura și funcția puțin cunoscute.

Proteina *Nef* (*negative factor*) este alcătuită din 206 aminoacizi, fiind exprimată intens, după infecție. *Nef* stimulează puternic replicarea virală, asigurând menținerea unei mari cantități de virus în celulă.

Genomul *HIV* este reprezentat de două copii de ARN monocatenar „+“, de aproximativ 9,5 kb, care conține 9 gene. La extremitățile genomului viral se găsesc secvențe *LTR* (*long terminal repeats*) esențiale pentru virus, deoarece conțin enhanceri, promotori și secvențe terminale. *LTR* de la extremitatea 5’ prezintă regiuni enhancer și promotor, implicate în inițierea și facilitarea transcripției, iar *LTR* de la capătul 3’ specifică situsul de poliadenilare.

ARN „+“, rezultat în urma transcrierii catenei „-“ a ADN viral dublu-catenar, poate funcționa ca ARN genomic în sinteza noilor particulele virale și ca ARNm pentru sinteza proteinelor virale.

Genomul viral conține trei cadre mari, deschise citirii, de pe care se transcriu gene comune tuturor retrovirusurilor (*gag, pol, env*) și câteva cadre mici, deschise citirii pentru genele *vpr, vpu, vif, tat, nef, rev.*

Gena *gag* codifică pentru un precursor peptidic, care este clivat în mai multe proteine virale (*p17, p24,p2, p7, p1, p5*).

Principalele proteine codificate de gena *pol* sunt reverstranscriptaza și integraza. Integraza funcționează analog transpozazei, codificate de secvențele de inserție, întâlnite la bacterii. Genele *pol* și *gag* se suprapun pe o distanță de aproximativ 241 nucleotide.

Gena *env* codifică pentru un polipeptid, care prin procesare formează proteinele *gp120* și *gp41*.

Genele *tat* și *rev* au doi exoni care se suprapun parțial, în diferite cadre de citire. Produșii de transcripție ai genelor *rev* și *tat* sunt prelucrați înainte de a fi traduși în proteine. Proteinele *Rev, Tat* și *Vpu* sunt sintetizate după ce are loc infecția. Proteina *Rev,* alcătuită din 116 aminoacizi, intervine în transportul specific al ARNm viral neprocesat sau parțial procesat, din nucleu în citoplasmă. Proteina *Tat*, alcătuită din 75 aminoacizi, se leagă la un situs specific din ARN nascent și împiedică terminarea prematură a transcripției.

Ciclul de replicare virală (Fig 19) prezintă o fază timpurie, în care are loc recunoașterea țintei și integrarea în genomul gazdei și o fază târzie, în care se exprimă controlat informația genetică virală, care permite sintetiza de noi particule virale, urmată de eliberarea lor din celula gazdă.

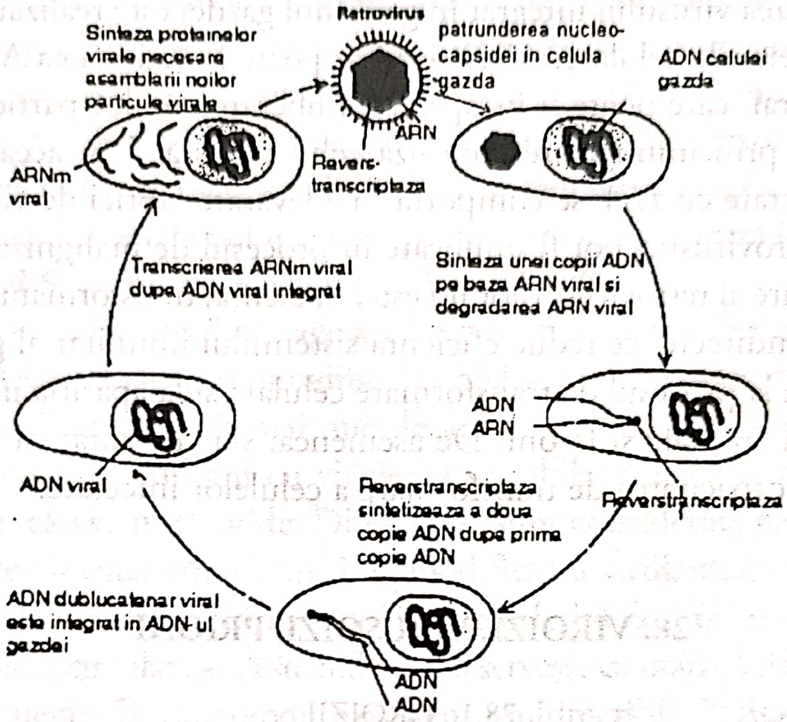

Retrovirus
Sinteza proteinelor virale necesare asamblarii noilor particule virale
patrunderea nucleo-capsidei in celula gazda
ADN celulei gazda
ARN
Revers-transcriptaza
ARNm viral
Transcrierea ARNm viral dupa ADN viral integrat
Sinteza unei copii ADN pe baza ARN viral si degradarea ARN viral
ADN
ARN
ADN viral
Reverstranscriptaza sintetizeaza a doua copie ADN dupa prima copie ADN
Reverstranscriptaza
ADN dublucatenar viral este integrat in ADN-ul gazdei
ADN
ADN

Fig. 19 — Reprezentarea schematică a ciclului de multiplicare a virusului *HIV*. (După Kathleen Talaro, 1993).

După pătrunderea virusului în celulă, are loc decapsidarea, urmată de copierea genomului viral ARN „+“ de către reverstranscriptaza virală, într-un hibrid ARN-ADN. Reverstranscriptaza virală este foarte performantă, deoarece poate folosi pentru sinteza ADN matrițe ARN sau ADN și, în plus, poate hidroliza cu mare specificitate ARN. În această etapă, reverstranscriptaza funcționează ca o ADN polimeraza-ARN dependentă. În etapa următoare, reverstranscriptaza funcționează ca o RN-ază, hidrolizând ARN din hibridul ADN-ARN. Monocatena ADN „-“ este utilizată ca matriță de către reverstranscriptază, pentru sinteza catenei complementare, rezultând un ADN dublucatenar (copia ADN a genomului viral). Reverstranscrierea are loc în citoplasma celulei infectate.

ADN dublu-catenar sintetizat pătrunde în nucleu și se integrează relativ randomic în genomul gazdei. Procesul de integrare, controlat de enzima virală numită *integraza*, este urmat de duplicarea situsul țintă din genomul gazdei.

Transcrierea virusului integrat în genomul gazdei este realizată de către ARN polimerazele celulare. ARN rezultat poate funcționa ca ARNm sau ca genom viral, care poate fi încapsidat. Eliberarea noilor particule virale se realizează prin înmugurire, fără liza celulei gazdă. Din această cauză, celulele infectate cu *HIV* se comportă ca adevărate fabrici de virusuri.

Unele retrovirusuri pot fi implicate în procesul de malignizare. Ciclul de multiplicare al retrovirusurilor nu este, în esență, transformant, însă prin mecanisme indirecte, ce reduc eficiența sistemului imunitar al gazdei, ele pot participa la procesul de transformare celulară și la apariția unor forme de cancer, la animale și la om. De asemenea, s-a constatat că proteinele virale nu au capacitatea de transformare a celulelor infectate.

28. VIROIZI, VIRUSOIZI, PRIONI

28.1. VIROIZII

Viroizii reprezintă o clasă de agenți infecțioși atipici, caracterizați printr-un genom ARN de mici dimensiuni. La plante, au fost descrise mai mult de 16 boli produse de viroizi, după o perioadă variabilă de latență. Acești agenți infecțioși se transmit la nivelul leziunilor sau prin polen și ovule.

Genomul viroizilor are o lungime de 246–375 baze și se caracterizează prin:

1. structura circular covalent închisă;
2. existența zonelor cu împerecheri intramoleculare;
3. catenele „+“ și „-“ sunt sintetizate de o ARN polimerază-ADN dependentă.
4. nu codifică proteine
5. replicarea viroizilor nu este dependentă de prezența unui virus helper.

Viroizii sunt împărțiți în două grupuri: grupul A — reprezentativ este *viroidul mozaicului latent al piersicilor* și grupul B, care este subdivizat în subgrupul B1 și subgrupul B2. Din subgrupul B1, fac parte viroizii ce determină apariția tuberculilor fusiformi, la cartofi, boala *cadang-cadang,* la palmieri, iar din subgrupul B2 viroidul frunzelor îndoite ale citricelor. Această clasificare se bazează pe analiza regiunii centrale a genomului care este conservată (*CCR*). Viroizii din grupul A nu posedă regiunea conservată, însă au activitate ribozimică. Date experimentale sugerează că, viroizi din grupul A se replică în cloroplaste, iar cei din grupul B în nucleu și nucleol. În nucleu se pot sintetiza între 200–10.000 copii viroidale. Pentru replicarea viroizilor sunt necesare minimum trei enzime: o ARN polimerază, o RN-ază și o ARN ligază. Se presupune că replicarea viroizilor este realizată de o ARN polimerază a gazdei, care înterpretează în mod eronat matrița ARN, ca fiind un fragment de ADN.

Cel mai studiat viroid este agentul bolii tuberculilor fusiformi ai cartofului (*PSTV*). ARN-ul său are o lungime de 359 baze și o greutate de aproximativ 130 KDa, fiind cu mult mai mic decât cel al ribovirusurilor mici. Acest agent patogen are tulpini cu virulență variabilă, tulpini la care genomul diferă prin câteva nucleotide. Diferențele sunt considerate responsabile de modificarea formei viroidului și de modificarea virulenței.

Replicarea viroizilor din grupul A este diferită de a celor din grupul B. ARN viroidal circular „+“, este infecțios și servește ca matriță pentru acțiunea ARN polimeraza II, care produce o catenă multimerică „-“. Această moleculă multimerică, la viroizii de tip B va participa la sinteza unui ARN „+“, care va fi clivat de o RN-ază în unități de lungimea viroidului. La viroizii din grupul A, molecula multimerică „-“ se autoclivează datorită activității ribozimice asociate. Moleculele de ARN rezultate, suferă un proces de ligare, generând forme circulare „-“. Urmează un nou ciclu de replicare, după modelul inelului rotativ, care de această dată generează o catenă multimerică „+“, care va fi clivată, datorită activității ribozimice. Moleculele de ARN „+“ rezultate vor fi ligate și circularizate, încheind ciclul de replicare. Diferențele dintre cele două grupuri de viroizi reflectă originea lor diferită.

Mecanismul prin care viroizii declanșează boli nu este cunoscut, mai ales că ARN viroidal nu conține informație pentru sinteza proteinică. În cazul viroidului ce provoacă boala tuberculilor fusiformi la cartof, ARN viroidal poate activa o proteinkinază, care inhibă sinteza proteinică a gazdei.

28.2. VIRUSOIZI

Virusoizii (denumiți și ARN satelit) sunt molecule monocatenare ribonucleotidice, circulare, alcătuite din câteva sute de nucleotide.

Replicarea și încapsidarea lor în celula gazdă, este dependentă de prezența unui virus helper.

28.3. PRIONI

Prionii sunt agenți patogeni care au fost descoperiți de Prusiner (1982), la oi și capre, la care determină leziuni degenerative progresive ale sistemul nervos central, traduse fenotipic prin pierderea coordonării mișcărilor, mers nesigur, în stadiile avansate deplasarea fiind imposibilă. Afecțiunea produsă de prioni se numește *scrapie*.

Ulterior, au fost descoperite afecțiuni umane determinate de prioni. Structura prionilor nu este elucidată. Se admite că aceste particule nu au genom, fiind alcătuite din proteine prionice (PrP), cu caracter hidrofob, de aproximativ 27–35KDa. Aceste caracteristici diferențiază prionii de toți ceilalți agenți infecțioși cunoscuți.

Gena *Prn-p,* ce codifică pentru *PrPc* (proteina normală neuronală), este prezentă în mod normal în genomul vertebratelor și al nevertebratelor. La om, gena *Prn-p* a fost localizată pe brațul scurt al cromozomului 20. În condiții normale, proteina *Prn-p* se sintetizează în cantități limitate și este expusă pe suprafața membranei neuronale. Această proteină este recirculată, fiind degradată intraneuronal.

Mutațiile spontane în gena *Prn-p* sunt extrem de rare și determină sinteza unei proteine anormale. Studiile comparative între proteina normală și formele mutante au evidențiat 18 tipuri de mutații punctiforme. Cel mai frecvent sunt afectați aminoacizii din pozițiile 66 (glicocolul este înlocuit cu prolina) și 102 (leucina este înlocuită cu prolina).

Proteina *PrP* anormală, modificată chimic sau conformațional, este studiată pentru stabilirea implicării sale în patologie. Pătrunderea *PrP* anormală în sistemul nervos este urmată de legarea sa de proteina *PrP* normală sau de modificarea activității enzimelor care controlează structura *PrP* normale. În ambele cazuri, proteinele *PrP* nou sintetizate sunt modificate structural și funcțional, au funcții fiziologice abolite și, fiind rezistente la degradare, se acumulează progresiv în sistemul nervos, producând degenerarea acestuia. In unele experiențe efectuate pe animale, s-a constatat că perioada de latență a bolii poate fi corelată cu cantitatea de proteină prionică administrată. La hamsterii care au fost injectați intracerebral cu proteina prionică, perioada de latență a bolii este invers proporțională cu doza administrată.

Ipoteza mai veche care susține că prionul este o particulă infecțioasă de mici dimensiuni cu materialul genetic învelit de proteina PrP, nu a fost complet abandonată.

La om, prionii sunt implicați în declanșarea următoarelor boli: *encefalopatia spongiformă, bola Kuru, insomnia familială fatală, boala Creutzfeldt-Jakob, sindromul Gerstmann-Straussler-Scheinker* și este urmărită posibilitatea implicării în *Altzheimer* și *scleroza multiplă.*

Boala Kuru este prima maladie prionică identificată la om. Această boală a fost întâlnită exclusiv la tribul *Fore,* din Papua-Noua Guinee, unde ritual, se consuma creierul cadavrelor. Acest canibalism ritual reprezenta probabil principala cale de transmitere a agentului patogen. *Boala Kuru* se caracterizează prin afectarea progresivă a coordonării motorii și în final imposibilitatea de mișcare. Renunțarea la canibalism a coincis cu reducerea cazurilor de *Boala Kuru.*

Boala Creutzfeldt-Jakob (*CJD*) are o frecvență redusă în lume. Afecțiunea debutează la aproximativ 60 de ani și afectează ambele sexe. S-au descris trei forme ale acestei boli: familiare, sporadice și forme apărute după intervenții medicale chirurgicale (ex. transplant de cornee, administrare de hormoni de creștere obținuți prin prelucrarea hipofizei persoanelor afectate). Afecțiunea se caracterizează prin apariția mișcărilor necoordonate și demență.

Agentul patogen al *CJD* s-a dovedit foarte stabil. Creierul persoanelor decedate de *CJD*, păstrat 10 ani în formol, au fost utilizat pentru experiențe pe șoareci. S-a constatat că agentul patogen al *CJD* nu este afectat de condițiile de păstrare, nici după această perioadă de timp.

Sindromul Gerstmann-Straussler-Scheinker este asemănător cu *CJD,* dar afecțiunea progresează mult mai rapid. Această afecțiune poate fi transmisă de la maimuțe.

Insomnia familială letală se caracterizează prin tulburări ale somnului, demență și disfuncții ale sistemului nervos vegetativ.

CAPITOLUL X

GENOMUL BACTERIAN

1. ORGANIZAREA GENOMULUI BACTERIAN

Organizarea genetică de tip procariot este întâlnită la bacterii, actinomicete și cianobacterii, care prezintă toate atributele organizării celulare, inclusiv autoreproducerea și morfogeneza autonomă. Particularitatea structurală distinctivă constă în faptul că materialul genetic bacterian nu este separat de citoplasmă printr-o structură membranară, astfel că procariotele nu prezintă un nucleu adevărat. Cromozomul celulei procariote nu este închis într-un spațiu definit, iar raporturile sale cu citoplasma sunt directe. El cuprinde setul complet de gene care determină toate activitățile celulei bacteriene, cum sunt: metabolismul, creșterea și diviziunea celulară, reglarea activităților intracelulare, etc. Celula bacteriană este un *sinergon,* deoarece toate procesele vitale (sinteze celulare, respirație celulară, fotosinteză bacteriană, etc.) sunt desfășurate la nivelul întregii celule, fără a se fi realizat compartimentarea acesteia în spații și structuri care să îndeplinească în mod specific asemenea funcții.

Materialul genetic al celulei bacteriene este reprezentat de cromozomul bacterian și de elementele genetice accesorii, plasmidele.

Cromozomul bacterian este diferit de molecula de ADN plasmidic, care poate uneori să fie tot atât de mare ca și cromozomul, dar care posedă gene de care celula se poate dispensa.

Aranjarea genelor structurale și a elementelor reglatoare pe cromozom reprezintă ambianța în care informația genetică este transcrisă și tradusă.

Cromozomul celor mai multe bacterii este reprezentat de o singură moleculă de ADN dublu catenar, circular și superspiralizat.

În celulele cu creștere rapidă, o nouă rundă de replicare se inițiază înainte ca cea anterioară să se fi încheiat. În aceste cazuri, celula bacteriană, haploidă în condiții de creștere normală, poate fi meroploidă (când anumite regiuni cromozomale se află în mai multe cópii) sau poliploidă (când cromozomul, în totalitate, se află în mai multe cópii). Cromozomul bacterian, aparent simplu, are totuși o structură complexă.

De regulă, fiecare celulă bacteriană are un singur cromozom dar, în cazurile în care replicarea cromozomului nu este urmată de diviziunea celulei, pot apare 2-4 cromozomi în aceeași celulă, ei neaducând informație genetică suplimentară, ci reprezentând cópii identice ale cromozomului inițial. Condiția normală a unei celule bacteriene este deci haploidă, având un singur set de determinanți genetici (gene).

Experimentele de hibridizare pentru regiuni țintă de pe cromozom, precum și tehnicile de clonare, au permis evidențierea unor cópii identice ale cromozomului, în număr de 40 până la 80, în celulele vegetative de *Azotobacter vinelandii,* și în număr de 20-25 cópii, în celule de *Azotobacter chroococcum.*

1.1 DIMENSIUNILE ȘI GEOMETRIA CROMOZOMULUI BACTERIAN

Dimensiunea cromozomului bacterian este variabilă, având 1000kpb la *Mycoplasma*, care este cea mai mică celulă cunoscută până în prezent, 4700kpb la *Escherichia coli* și 14000kpb la *Myxococcus* și *Calothrix.* Micoplasmele sunt agenți infecțioși, paraziți intracelulari, care își divid mai întâi nucleoidul (fig.1), respectând principiul că orice celulă provine dintr-o celulă preexistentă.

Dimensiunea cromozomului de la *Myxococcus sp.* variază între 5700 și 12700kpb, atunci când este estimat autoradiografic sau colorimetric, și 9450kpb, când se utilizează ca metodă de măsurare electroforeza în câmp pulsator. Genomul la *Streptomyces coelicolor* a fost estimat la 10750kpb prin metode clasice, în timp ce tehnicile de digestie enzimatică și de electroforeză convențională îl plasează între 7000 și 8000kpb. La cianobacterii, studiile de cinetica denaturării/renaturării ADN au indicat un genom de 1280kpb la tulpini de *Calotrix.* La bacteriile lactice

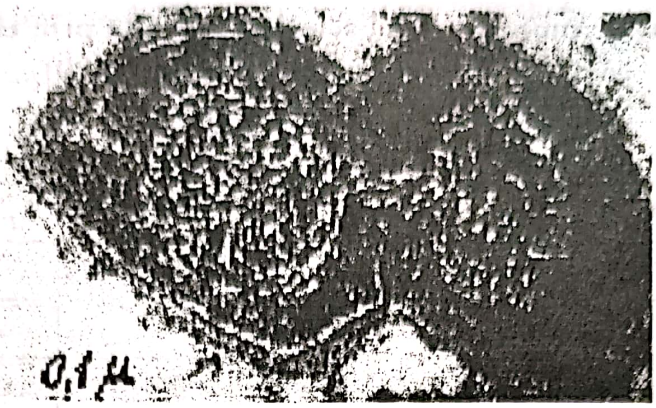


Fig. 1 — Imagine de microscopie electronică în care se observă diviziunea nucleoidului de la *Mycoplasma sp.* (după G.W.Fuhs, 1969)

(*Streptococcus thermophilus*, membri ai genurilor *Lactobacillus, Leuconostoc* și *Pediococcus*) genomul măsoară între 1.8 și 3.4Mpb.

Comparativ cu genomul viral, genomul bacterian este mult mai mare și mai complex, fiind organizat pe principiul economiei și eficienței maxime.

Cromozomul circular bacterian reprezintă suportul fizic al unicului grup de linkage al genelor, toate genele bacteriene fiind transmise în bloc, de la celula mamă la celulele fiice. El reprezintă cea mai mare moleculă descrisă până în prezent, într-un sistem biologic, având, de exemplu, o circumferință de 1400μm, la bacteria *E.coli.* Circularitatea cromozomului bacterian îl protejează față de acțiunea depolimerizatoare a unor enzime nucleazice, de tipul deoxiribonucleazei. De asemenea, îi permite să se replice integral, fără să necesite telomere sau capete terminale redundante. *Rhodobacter spaeroides* prezintă doi cromozomi circulari (Tabel 1).

Cromozomi lineari au fost descriși la unele specii de bacterii precum: *Borrelia burgdorferi B31, B.hermsii, Streptomyces lividans, S.ambofaciens, Rhodococcus fasciens* etc. Particularitățile structurale ale unor asemenea cromozomi lineari bacterieni sunt descrise într-un alt subcapitol.

Forma circulară a cromozomului bacterian a fost dovedită indirect, prin urmărirea procesului de conjugare bacteriană, în cadrul căruia, transferul de gene de la celula donoare la celula receptoare se face cu o secvențialitate precisă, eșalonată în timp. Ulterior, s-au adus dovezi directe, electrono–optice, prin care s-a confirmat circularitatea cromozomului bacterian. Toate bacteriile, cu unele excepții, prezintă cromozom circular.

Tabel 1: Mărimea cromozomului bacterian estimată prin electroforeză în câmp pulsator (Krawiec și Riley, 1990)

Microorganism	*Mărime (kpb)*	*Geometrie*
Anabaena sp. Tulpina PCC 7120	6400	circular
Bacillus cereus	5700	circular
Bacillus subtilis	Incomplet	circular
Borrelia burgdorferi B31	950	linear
Brucella abortus 544	2600	ND
Brucella melitensis 16 M^T	2600	ND
Campylobacter coli	1714	ND*
Campylobacter jejuni UA 580	1721**	circular
Campylobacter laridis UA 487	1451	ND
Caulobacter cescentus	4000	circular
Chlamydia psittaci AB7, 1H, 1B	1450	ND
Chlamydia trachomatis L2	1450	ND
Clostridium perfringens	3600	circular
Enterococcus faecalis	2600	ND
Escherichia coli K-12	4700	circular
Haemophilus influentzae V23	1980	circular
Haemophilus influentzae Rd	1824	circular
Haemophilus parainfluentzae	2340	circular
Lactococcus cremoris	2600	ND
Lactococcus lactis	2500	ND
Mycoplasma gallisepticum PG 31	1050	ND
Mycoplasma genitalium 585	ND	340
Mycoplasma hypopneumoniae, tulpina J	1140	ND
Mycoplasma iowae	1280	ND
Mycoplasma mobile	780	circular

Microorganism	***Mărime (kpb)***	***Geometrie***
Mycoplasma pneumoniae	785	circular
Mycoplasma synoviae	900	ND
Mycoplasma mycoides, *subsp. Mycoides Y* *subsp. Mycoides GC 1176-2*	 1240 1330	 ND ND
Myxococcus xantus	9454	ND
Porochlamydia buthi	1550	ND
Porochlamydia chironomi	2650	ND
Pseudomonas aeruginosa	5900	circular
Rhodobacter sphaeroides 2.4.1 *cromozom 1* *cromozom 2*	 3046 914	 circular circular
Rickettsiella gryli	2100	ND
Rickettsiella melolanthae	1720	circular
Staphylococcus aureus	2860	ND
Staphylococcus aureus	2748	ND
Streptococcus sanguis	2300	ND
Streptococcus thermophilus	1700	ND
Sulfolobus acidocaldarius	ca. 3100	circular
Thermococcus celer	1800	circular
Ureaplasma urealyticum 960^{T}	900	circular

ND: nedeterminat
*circular (Taylor și colab., 1992)
**1725 +/- 5.9 kpb (Newnham și colab., 1996)

Nu există încă date complete despre organizarea unui asemenea inel molecular, de peste 1000μm lungime, care este cromozomul bacterian, și care este adăpostit într-o celulă care nu depășește lungimea de 1-2μm (fig.2).

Se poate deduce cu ușurință că molecula de ADN bacterian trebuie să suporte un înalt grad de superrăsucire și împachetare, arhitectura sa finală

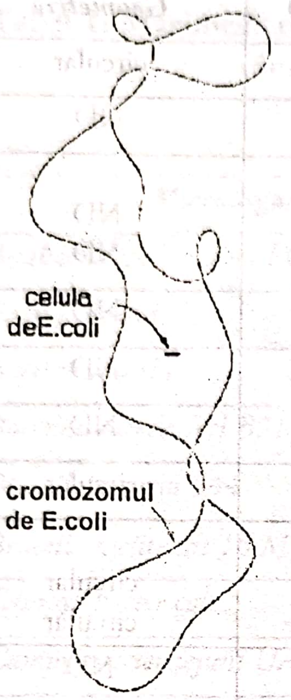


Fig. 2 — Diagramă în care se prezintă mărimea relativă a celulei de *E. coli* și a moleculei de ADN din *E. coli*. (după Freifelder, 1987)

fiind dictată de restricțiile spațiale impuse de dimensiunile celulei bacteriene.

Conform structurii descrise de Watson și Crick, cele două catene ADN sunt răsucite una în jurul celeilalte, o dată la 10,5 perechi de baze, realizându-se un dublu helix cu spiralizare de dreapta și pozitivă. Dacă distanța dintre două spire este mai mică de 10,5 perechi de baze, helixul este negativ. Cea mai mare parte a ADN bacterian este superspiralizat negativ, pe aceeași moleculă existând regiuni de spiralizare negativă puternică sau slabă, precum și regiuni de spiralizare pozitivă. Molecula de ADN bacterian nu are o configurație de spiralizare de dreapta uniformă (A-ADN, B-ADN), pe distanțe scurte putând fi stânga-spiralizată (Z-ADN), cruciformă sau triplu catenară.

ADN superspiralizat, aflat sub tensiune, eliberează energie prin separarea celor două catene, energie care este utilizabilă pentru replicare, recombinare, și activarea promotorilor. Superspiralizarea ADN este modulată de topoizomeraze.

În cromozomul de *E. coli*, fiecare domeniu are un grad diferit de superspiralizare și nu influențează superspiralizarea domeniilor adiacente.

Acest lucru indică faptul că buclele sunt atât de torsionate, încât apar ca și când cromozomul ar fi organizat într-o serie de „plasmide“ circulare de câte 50kb. Responsabilă de realizarea superspiralizarii este enzima ADN giraza, numită și topoizomeraza II, după cum demonstrează experimentele cu compuși care inhibă acțiunea acestei enzime. Genele *gyrA* sunt responsabile de sinteza subunităților cu rol în superspiralizare, iar *gyrB* codifică subunitățile care furnizează energia necesară spiralizării, ele având situsuri ATP.

Dacă celulele de *E.coli* sunt tratate cu inhibitori, cum ar fi cumermicina (*coumermycin*), cromozomul bacterian își pierde rapid starea de superspiralizare. În afară de ADN giraza, care induce spiralizări superhelicale negative în cromozomul bacterian, și a cărei acțiune e dependentă de ATP, bacteriile sunt echipate și cu enzima topoizomeraza I, care îndepărtează aceste spiralizări, inducând o stare relaxată. Activitatea topoizomerazei I nu necesită consum de ATP. La mutantele la care activitatea topoizomerazei I este afectată, se constată că nucleoidul are o stare de superspiralizare superioară celei normale. Aceste mutante acumulează cu predilecție mutații care afectează activitatea girazei, afectând starea normală de superspiralizare a nucleoidului.

Datele experimentale recente au indicat prezența la bacteria *E.coli*, precum și la cianobacteriile *Anabaena* și *Aphanocapsa*, a unor proteine bazice asemănătoare histonelor, cu greutate moleculară mică (cca.10.000daltoni). Datorită încărcăturii pozitive pe care o posedă, aceste proteine neutralizează sarcina negativă a grupărilor fosfat ale ADN, având astfel un efect stabilizator asupra arhitecturii cromozomului bacterian. La realizarea și menținerea structurii superspiralizate a cromozomului contribuie și unele specii moleculare de ARN, după cum demonstrează tratamentul cu RN-ază, care conduce la relaxarea structurii cromozomului.

Cercetătorii Y.Rouviere Janiv și F.Gros (1976) au izolat din arhebacteria *Thermoplasma acidophilum* o proteină bazică cu greutate moleculară mică, de natură neribozomală, ce se poate asocia cu ADN, ca și histonele eucariote. Această proteină, numită **HU**, cu o compoziție în aminoacizi asemănătoare proteinei echivalentă izolată din bacteria *E.coli* și cianobacterii, prezintă o secvență de aminoacizi similară, dar nu identică, cu secvența histonică H2B, de la eucariotele tipice. Proteinele bazice identificate la procariote, asociate cromozomului bacterian, nu realizează cu ADN raportul echimolar de 1/1, tipic pentru raportul ADN/histone, de la eucariote. Aceste proteine asociate cu cromozomul bacterian au fost denumite proteine *histone-like*. La *E.coli* au fost identificate 9 clase de astfel de proteine bazice, cu greutate moleculară de 10-30kDa. Cea mai importantă clasă este reprezentată de proteinele **HU** care au 10kDa, și prezintă două subunități **HUa** și **HUb.** Aceste subunități sunt codificate de genele *hupA* și, respectiv, *hupB*. Secvența în aminoacizi a celor două subunități prezintă o homologie de 69%.

Proteinele HU se asociază cu ADN în manieră situs nespecifică, fiind capabile să înfășoare molecula de ADN în jurul lor. Din asocierea proteinelor HU cu ADN, se formează structuri *nucleosome-like*, o singură structură de acest tip fiind capabilă să se asocieze cu o secvență de ADN de 200pb. Complexarea HU-ADN nu este uniformă, dispunându-se cu precădere spre zonele extreme ale buclelor, astfel încât structurile nucleosome-like sunt într-o continuă mișcare, de-a lungul moleculei de ADN. Proteinele HU au un rol fundamental în procesele genetice în care are loc interacția dintre ADN și proteine și anume în transcriere, replicare și recombinare.

Alte proteine histone-like importante sunt reprezentate de: proteina **H1**, care are o structură foarte asemănătoare cu histona H2A de la eucariote; proteina **HNS,** care se atașează de regulă situs-nespecific, însă preferențial de secvențele reglatoare și de genele reglatoare aferente genelor implicate în metabolizarea azotului; **IHF** (*integration host factor*), care se asociază preferențial cu regiunile din cromozomul bacterian implicate în procesele de recombinare genetică neomoloagă.

1.2. ARHITECTURA CROMOZOMULUI BACTERIAN (NUCLEOIDUL BACTERIAN).

În scopul înțelegerii modului de împachetare a moleculei de ADN s-au efectuat studii asupra nucleoidului la *E.coli*, acesta fiind ușor de izolat din celula bacteriană.

Proprietățile hidrodinamice ale nucleoidului sunt în strânsă corelație cu schimbarea formei acestuia. Rata de sedimentare a nucleoidului descrește de îndată ce are loc creșterea vitezei de centrifugare. Acest lucru se explică, pentru ADN linear, prin faptul că forța de frecare exercitată la capetele moleculei este mai mare decât aceea din mijlocul moleculei, astfel că se produce o extindere conformațională, iar molecula căpătă forma literei V. Cu cât crește viteza de rotație, cu atât crește și gradul de extensie și coeficientul de frecare. Acest fapt are drept consecință reducerea vitezei de sedimentare.

Pentru a fi inclus într-o celulă, materialul genetic este compactat de mai mult de 1000 de ori, într-o structură microscopică distinctă numită **nucleoid bacterian**. Prin urmare, molecula de ADN este astfel organizată, încât să ocupe un spațiu relativ mic în celulă, dar să fie accesibilă activităților de replicare, recombinare și transcriere, precum și proceselor complexe reglatoare.

Nucleoidul bacterian este format dintr-o singură moleculă de ADN, un procent constant de proteine, precum și o cantitate variabilă de ARN. Moleculele proteinice și cele de ARN contribuie la realizarea și menținerea arhitecturii cromozomului bacterian, care prezintă aproximativ 400 de bucle, fiecare dintre acestea prezentând, la rândul ei, numeroase superspiralizări (fig.3).

Tratamentul cromozomului bacterian cu enzima DN-aza poate conduce la apariția unor incizii monocatenare la nivelul moleculei de ADN, facilitând tranziția către o structură mai relaxată, datorată rotației libere a unei catene în jurul celeilalte catene. Nu are loc însă o rotație liberă a întregii molecule de ADN, ci doar o rotație la nivelul buclei cromozomale asupra

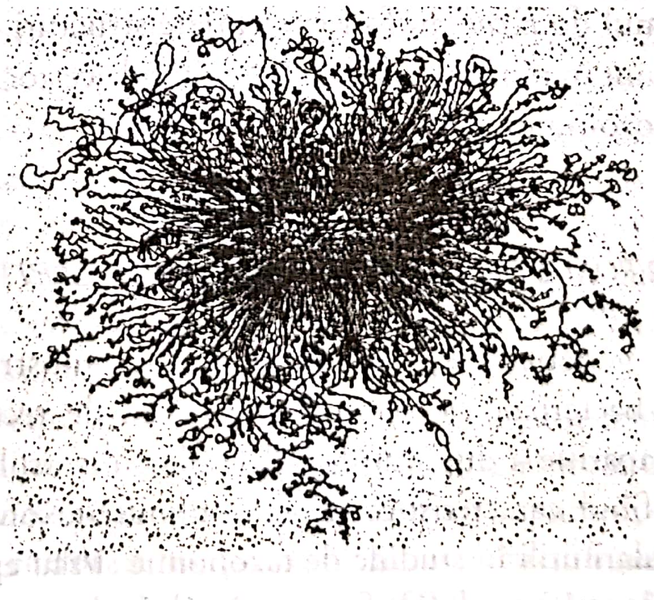


Fig. 3 — Cromozomul de ***E.coli,*** vizualizat în microscopie electronică; el prezintă multiple bucle, care emerg dintr-o regiune centrală (după Freifelder, 1987)

căreia a acționat DN-aza, ceea ce sugerează că fiecare buclă superspiralizată a cromozomului bacterian, este independentă din punct de vedere structural. Individualizarea buclelor este realizată cu ajutorul proteinelor și a moleculelor de ARN.

Dacă molecula de ADN de la *E.coli* ar fi pur și simplu împachetată în cea mai compactă configurație geometrică posibilă, ar fi pliată de circa 2500 de ori și nu ar ocupa decât 5% din volumul nucleoidului. Rezultă că restul spațiului aferent nucleoidului mai conține și altceva decât ADN, și că problema compactării cromozomului nu implică doar plierea, ci și menținerea acestuia într-o stare funcțională. Experimentele realizate în acest sens au arătat că moleculele lungi de ADN nu stau întinse, ci formează bucle întâmplătoare, datorită mișcării browniene. Aceste molecule rămân rezonabil drepte, doar pe segmente de aproximativ 50nm, adică 150bp. Această lungime depinde și de secvența de baze locală, care poate genera pliuri permanente în molecula de ADN. Într-o asemenea moleculă pliată randomic, nu există nici un control asupra vecinătății diferitelor segmente ADN, iar plierea randomică este permanent schimbătoare.

1.2.1 DOMENIILE DE BUCLARE

În cromozomul de *E.coli* au fost evidențiate structuri numite *domenii de buclare* care sunt în număr de 30-200. Numărul acestor domenii variază și conferă cromozomului o structură florală.

1.2.2 ROLUL ELEMENTELOR GENETICE REPETITIVE

Elementele genetice repetitive constituie substratul dinamicii cromozomului bacterian, ele servind ca situsuri de recombinare și, în consecință, de apariție a duplicațiilor, delețiilor, inversiilor, rearanjărilor cromozomale, fiind caracteristice pentru anumiți taxoni și constituind markeri moleculari utili în studiile de taxonomie și/sau epidemiologie.

Secvențele repetitive scurte, frecvent întâlnite la procariote, au rol în interacțiunea dintre proteine și ADN. De asemenea, acestea pot fi considerate regiuni de recunoaștere a matriței în timpul replicării, precum și semnale pentru recombinare, transpoziție, inversie, excizie, etc.

Secvențele scurte de ADN, repetate tandemic, sunt dispersate într-un număr mare de cópii per genom bacterian, identificarea lor constituind un marker molecular taxonomic și epidemiologic.

Secvențele cu lungime variabilă au fost denumite **VNTR** (*variable number of tandem repeat*). Schimbările produse în numărul de unități repetitive dintr-un anumit locus genetic reprezintă sursa variabilității clonale.

Regiunile repetitive palindromice (REP), alcătuite din 70 perechi baze, evidențiate în afara regiunilor codificatoare, sunt localizate de regulă, în apropierea situsurilor unde are loc fenomenul de *crossing-over*. Sunt cunoscute însă regiuni cu înalt grad de similitudine cu REP. Acestea sunt alcătuite din 30 perechi baze și sunt localizate în interiorul regiunii codificatoare a genei *nrd*A, la *E.coli*. Regiunile repetitive adiacente sunt separate de secvențe mai scurte, de 25 perechi baze. Acest tip de structuri genetice reprezintă aproximativ 0.5% din genom la *E.coli* sau *Salmonella typhimurium*. Ele au situsuri de legare pentru HU și ADN giraze, astfel, sugerându-se rolul lor în plierea nucleoidului. Evidențierea situsurilor de legare pentru ADN polimeraza I, la nivelul secvențelor REP, conduce la supoziția implicării lor în procesele de replicare și reparare.

La *E.coli*, în apropierea locusului *iap* (codifică pentru fosfataza alcalină), a fost identificată o regiune de 29 baze, prezentă în 14 cópii. Treisprezece dintre aceste cópii diferă numai prin 1 sau 2pb.

Situsurile Chi la *E.coli* sunt elemente genetice accesorii, alcătuite din 8 baze (5'-GCTGGTGG-3'), cu rol de secvențe de recunoaștere pentru endonucleaza RecBCD. Acestea apar la un număr important de bacterii înrudite cu *E.coli*, având rol de situsuri de intensificare a recombinării între membri familiei *Enterobacteriaceae*. Ele se repetă la fiecare 5kpb și, prin urmare, se poate estima un număr de aproximativ 940 cópii ale acestor situsuri chi, în cromozomul de *E.coli*.

Situsurile Dam (*DNA adenine methylation*) sunt semnale de reglare importante, alcătuite din 4 baze, 5'-GATC-3'. Ele au rol în recunoașterea sectorului de ADN nou sintetizat în timpul replicării, în conservarea funcțională a genelor și în procesul de reparare, fiind distribuite în cromozomul bacterian, la aproximativ 250pb distanță. În regiunea *ori*, asemenea situsuri se află în 8 cópii, iar în regiunea adiacentă, pe o distanță de 350pb, în 12 cópii. În afară de replicare, aceste structuri par a fi asociate unor gene implicate în funcția de transpoziție a unor gene structurale, precum și cu infecția bacteriofagică.

Zone repetitive alcătuite din patru nucleotide, *CAAT*, au fost identificate la *Haemophilus influenzae*, cu un oarecare rol în reglarea expresiei genice.

Cianobacteria unicelulară, *Micrococcus aeruginosa*, prezintă două tipuri de regiuni repetitive extragenice, (*REP-A* si *REP-B*), în multiple cópii, la nivelul cromozomului acestei bacterii. Aceste regiuni repetitive au fost evidențiate prin metode de hibridizare. Secvențele palindromice, identificate a fi componente majore ale genomului la *E.coli* și *S.typhimurium*, pot reprezenta până la 0.5% din genom.

Elemente repetitive diverse sunt răspândite și în genomul speciilor de *Mycobacterium*. Sunt bine cunoscute elementele direct repetitive, bogate în GC (36pb per element), utilizate ca markeri genetici în studiile de epidemiologie moleculară. Au fost identificate secvențe polimorfice repetate în tandem (PGRS), cu un grad mare de heterogenitate, utilizate în egală măsură în caracterizarea moleculară a tulpinilor implicate în evenimente epidemice.

Secvențele repetitive lungi tandemice *(LTRS)*, de la cianobacteria *Anabaena*, fixatoare de azot, sunt alcătuite din 37pb și conțin o secvență invers repetată. Astfel de secvențe repetitive se pot asocia cu patogenitatea și virulența unor grupe taxonomice *(E.coli, Campylobacter, Clostridium, Haemophilus, Vibrio)* și pot participa la rearanjările cromozomale. În unele cazuri, ele pot constitui markeri moleculari utili în diagnostic și studii epidemiologice (IS*6110* la *Mycobacterium tuberculosis*, IS*200* la *Salmonella*, IS*1004* la *Vibrio*).

1.3. OPERONII BACTERIENI

O caracteristică esențială a genomului bacterian, neîntâlnită la genomul eucariot, este aceea că genele corelate funcțional apar grupate în genom, reflectând organizarea lor în **operoni**, care reprezintă asocieri de gene ce sunt transcrise împreună. Uneori, operonii înrudiți funcțional sunt așezați în imediată vecinătate. În cadrul operonilor, genele sunt în general strâns spațiate, cu „spații“ între ele de numai câteva zeci de nucleotide. Secvențele care leagă ARN polimeraza și acționează ca semnale pentru inițierea transcrierii apar numai la capetele 5' ale operonilor, nu și în interiorul acestora, astfel că spațiile intergenice din interiorul operonilor conțin doar secvențe de legare a ribozomilor. Translația poate începe de la capătul 5' al ARN mesager, corespunzător fiecărei gene, din cadrul operonului.

La *E.coli* s-a constatat că operonii înruduți fiziologic sunt randomizat distribuiți în cromozomul bacterian. Excepție fac însă, operonii implicați în metabolizarea glucozei, care sunt localizați în patru zone diametral opuse pe cromozom. S-a constatat că schimbarea localizării unor operoni pe cromozomul de *E.coli* nu are efecte negative asupra funcționării operonului, excepție făcând regiunile de lângă situsurile de origine a replicării și de terminare a replicării, unde există o *organizare supraoperonică a materialului genetic*, iar modificările care afectează aceste regiuni au efecte negative.

Se cunosc puține lucruri despre spațiile dintre diferiți operoni sau dintre genele care sunt transcrise individual. Acestea sunt în general scurte, de câteva zeci de kilobaze, și par să reprezinte material genetic nefuncțional. La unii operoni bine studiați, a fost determinată direcția de transcriere. În unele cazuri, aceasta este în sensul mersului acelor de ceasornic, pe harta conventională, pe când în alte cazuri, aceasta este în sens invers. Uneori, doi operoni înrudiți funcțional sunt transcriși divergent, pornind de la o regiune de control comună. Este cazul operonilor biotinei și argininei. Aceasta dovedește că ambele catene ale ADN genomic sunt utilizate pentru transcriere, dar în părți diferite ale genomului, și care, în general nu se suprapun.

La eubacterii, secvența codificatoare nu este întreruptă de introni. La **arhebacterii**, un grup special de bacterii, adaptate pentru viața în condiții extreme, genele prezintă introni, și par să aibă o organizare a materialului genetic intermediară între procariote și eucariote, motiv pentru care sunt încadrate într-un regn separat, regnul **Archaebacteria** sau, mai recent, **Archaea**. Genele arhebacteriilor, asemănător eubacteriilor sunt organizate în operoni. Alte trăsături caracteristice pentru aceste microorganisme sunt: modificări în compoziția de baze azotate la nivelul moleculelor de ARN de transfer, prezența unor ARN polimeraze specifice și a unor ribozomi cu compoziție distinctă și formă particulară.

1.3.1. OPERONUL LAC AL BACTERIEI ESCHERICHIA COLI

Operonul lac (lactoză) al eubacteriei *E.coli* este cel mai utilizat sistem celular pentru explicarea fenomenul de **inducție genetică**. Acest concept, a fost postulat pentru prima dată de către F.Jacob și J.Monod, în anul 1961, pentru a descrie procesul de reglare a metabolismului lactozei, la această bacterie. Ulterior, au mai fost descriși și alți operoni inductibili, care funcționează similar operonului lac, astfel că, au fost furnizate date convingătoare cu privire la ideea că, mediul celular poate avea un impact mare asupra expresiei genice.

Operonul pentru lactoză este alcătuit din trei segmente sau loci ADN: a) **locusul reglator**, ce este alcătuit din gena care codifică pentru proteina capabilă de a represa operonul, numită încă represor; b) **locusul de control**, care este alcătuit din două segmente genice: *promotor*, (identificat ca fiind un palindrom) și *operator*. De la nivelul locusului de control este inițiată transcripția genelor structurale; 3) **locusul structural**, alcătuit din trei gene, fiecare dintre acestea codificând pentru o enzimă diferită (β-galactozidaza, permeaza și tio-galactozid-transacetilaza) necesare în catabolismul lactozei (fig.4). Promotorul, operatorul și genele structurale sunt așezate în contiguitate, pe câtă vreme, situsul reglator este, de regulă, situat în amonte, la o oarecare distanță de locusul de control.

În sistemele inductibile, în absența substratului inductor (lactoza sau allolactoza), operonul este blocat de către represor, si nu permite sinteza enzimelor implicate în catabolizarea lactozei (fig 4a). Acest lucru este posibil datorită conformației alosterice a represorului, care are două situsuri: unul pentru operator, și altul pentru inductor. Așadar, în absența lactozei, represorul se leagă de operator, blocând astfel transcrierea genelor structurale, localizate în aval de acesta. Represorul funcționează deci, ca un lacăt pentru operator, iar dacă operatorul este blocat, genele structurale nu pot fi transcrise.

În momentul în care lactoza este prezentă în mediul celular, au loc evenimente care au rolul de a comuta operonul din starea represată în starea activată, ceea ce înseamnă inducția sa funcțională.

Deoarece lactoza, este responsabilă de stimularea sintezei proteinelor, adică de inducția operonului lac, ea este numită **inductor**. Prin legarea lactozei la situsul corespunzător din represor, are loc o modificare a conformației represorului, care conduce la dislocarea acestuia de pe segmentul operator (fig 4b). Segmentul de control care fusese inițial blocat, acum este accesibil ARN-polimerazei, care poate începe transcripția de la nivelul situsului operator. Genele structurale sunt transcrise într-un singur transcript, care codifică pentru toate cele trei enzime, și astfel ARNm policistronic (cistronul reprezentând o unitate genetică funcțională ce determină secvența aminoacizilor unui lanț polipeptidic specific) este

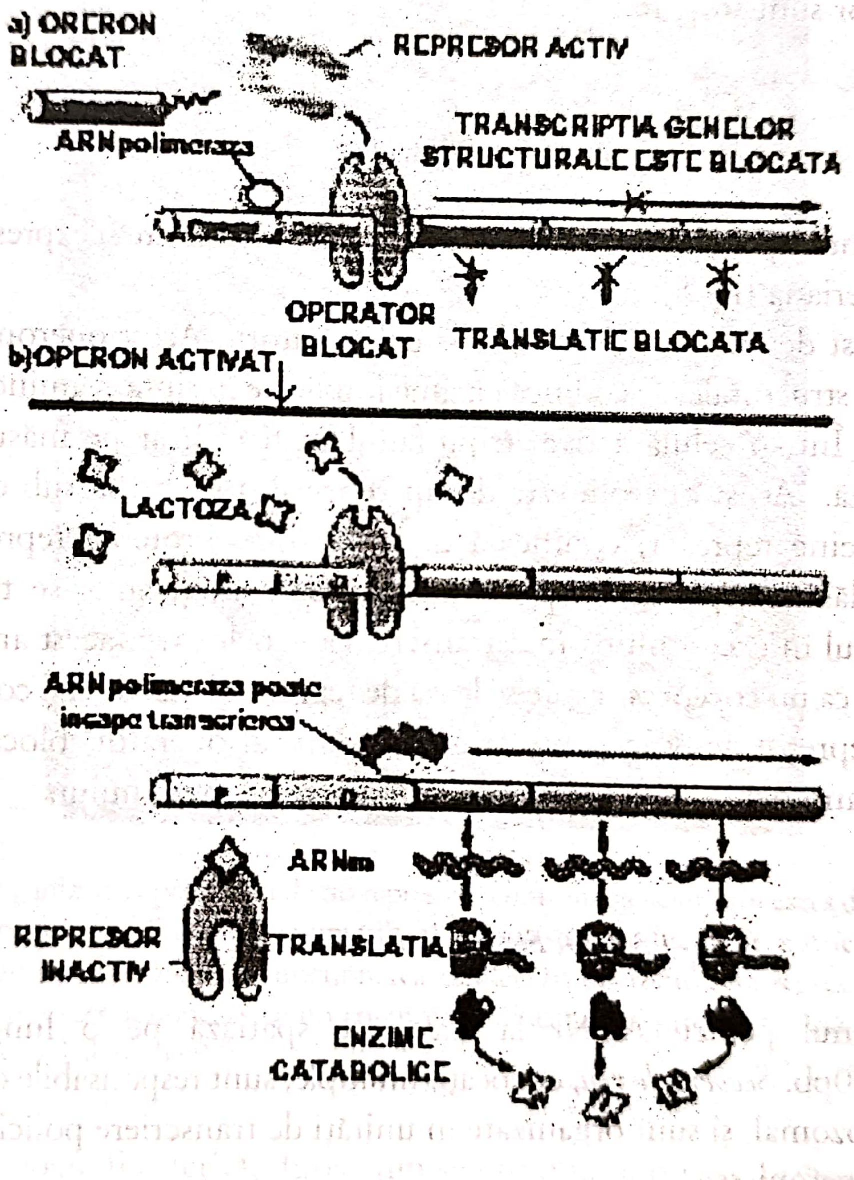

a) OPERON BLOCAT
REPRESOR ACTIV
ARN polimeraza
TRANSCRIPTIA GENELOR STRUCTURALE ESTE BLOCATA
OPERATOR BLOCAT
TRANSLATIE BLOCATA
b) OPERON ACTIVAT
LACTOZA
ARN polimeraza poate incepe transcrierea
ARNm
REPRESOR INACTIV
TRANSLATIA
ENZIME CATABOLICE

Fig. 4 — Operonul *lac*. a) În absența substratului inductor, represorul leagă operatorul și inhibă trascripția genelor structurale. b) Inductorul se leagă la represor scăzându-i acestuia afinitatea pentru operator și astfel este inițiată transcripția genelor structurale pentru catabolizarea lactozei (prelucrare după Talaro și Talaro, 1993).

translatat ca o unitate. După sinteză, enzimele sunt clivate în unități individuale, care participă la catabolismul lactozei. În momentul în care catabolizarea lactozei prezentă în mediul celular este completă, nu mai este necesară sinteza enzimelor catabolice, astfel că ordinea evenimentelor se inversează. Nemaifiind suficient de multă lactoza pentru a inhiba represorul, acesta este din nou liber de a se atașa la situsul operator. Operatorul este astfel blocat, iar transcripția genelor structurale și sinteza proteinelor sunt stopate.

1.3.2. OPERONUL trp

Operonul trp (triptofan), este un exemplu de organizare și expresie genică tipic bacteriană (fig.5).

El a fost descris de C.Yanofsky și colaboratorii. Acest operon conține cinci gene structurale, ce codifică enzime implicate în sinteza aminoacidului triptofan. Într-o celulă activă, triptofanul va fi utilizat pe măsură ce se sintetizează. Acest operon, este de tip **represibil** și se află sub controlul unei proteine represor, codificată de gena *trpR*. Proteina represor este inactivă, lăsând operonul trp să funcționeze, sintetizându-se triptofan. Triptofanul în exces inhibă însă transcrierea genelor trp, acest aminoacid acționând ca un **corepresor** care se leagă de represorul inactiv și îl convertește într-un represor activ, capabil de a bloca situsul operator, blocând prin aceasta transcrierea genelor implicate în sinteza triptofanului.

1.3.3. OPERONUL PENTRU ARNr

Operonul pentru ARNr la *E.coli* se spațiază pe o lungime de 6000-7000pb. *Secventele rrn,* cu locații multiple, sunt responsabile de sinteza ARN ribozomal, și sunt organizate în unități de transcriere policistronică, numite operoni *rrn.*

Pornind de la promotor, genele sunt aranjate în următoarea ordine: 5'-16S-23S-5S-3' (fig.6). Această așezare a genelor în operon nu este universală. Ordinea genelor care codifică pentru cele trei tipuri de molecule

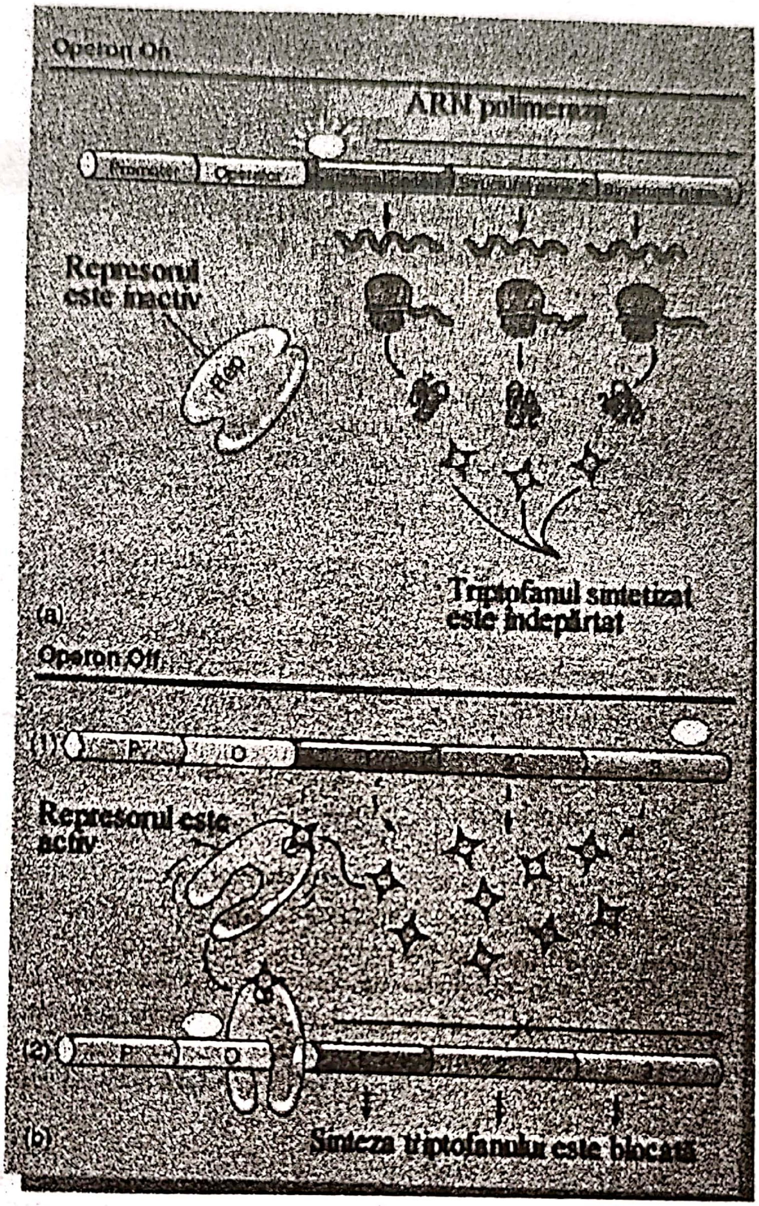

Operon On
ARN polimeraza
Promoter
Operator
Represorul este inactiv
Triptofanul sintetizat este îndepărtat
(a)
Operon Off
(1)
P
O
Represorul este activ
(2)
P
O
(b)
Sinteza triptofanului este blocată

Fig. 5 — Organizarea operonului de tip represibil: controlul genelor prin exces de nutrienți. a) un operon represibil este funcționabil atâta timp cât producția de nutrienți nu este atât de mare încât să afecteze funcționarea celulei. b) operonul este represat deoarece triptofanul în exces acționează ca un corepresor, blocându-și propria sinteză (prelucrare după Talaro și Talaro, 1993)

de ARNr poate fi diferită, după cum se pot întâlni operoni ribozomali cu structură incompletă, chiar la aceeași specie.

La *Campylobacter jejuni* și *C.coli* au fost identificate trei cópii ale genelor 16S și 23S. Ele sunt localizate pe cromozomul bacterian în doi operoni

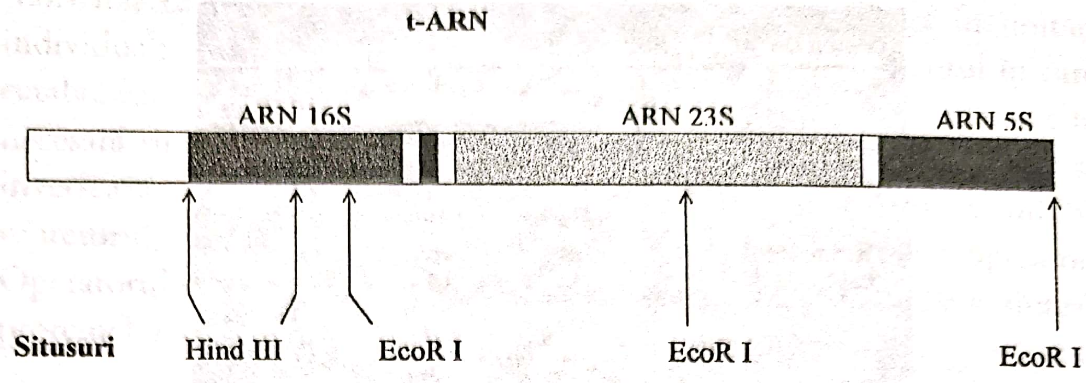


Fig. 6 — Modelul structural al operonului ARNr la *E. coli* (Grimont și Grimont, 1990)

23S - 5S, doi operoni 16S și un operon 16S - 23S - 5S. Alte exemple sunt prezentate în tabelul 2.

În regiunea intergenică 16S-23S se află o secvență variabilă care conține gene codificatoare pentru diferite specii de ARNt, precum și secvențe direct repetitive.

Analiza cu endonucleaze de restricție a acestei regiuni este relevantă, aceasta fiind un important marker taxonomic și epidemiologic.

Poziția operonilor *rrn* pe cromozomul bacterian diferă de la un grup taxonomic la altul. La *E.coli* acești operoni sunt localizați pe o jumătate de cromozom, între *oriC* și *oriT*, mai aproape de originea replicării. La *Clostridium perfringens* și *Bacillus subtilis* se distribuie pe o treime din harta genetică a cromozomului.

Operonii *rrn* sunt prezenți pe cromozomul bacterian în multiple cópii, variind de la 2 până la 11 per genom, iar numărul și poziția diferitelor gene sunt specie–specifice, în structura acestora.

La *E.coli* și *S.typhimurium* există 7 cópii situate în poziții similare în cromozomul bacterian. La aceste microorganisme au fost semnalate atât deleții și duplicații (ca urmare a crossing-over-ului între secvențe rrn, direct repetate), cât și inversii (ca rezultat al crossing- over-ului la nivelul secvențelor rrn, invers repetate).

B.subtilis și *C.perfringens*, membri ai aceluiași grup filogenetic, au un număr identic de cópii *rrn*, însă numărul secvențelor repetate este specie-specific. Unele specii de *Mycobacterium* au creștere lentă, având un singur operon *rrn* iar altele au creștere rapidă, având doi operoni *rrn*.

Analizele structurale comparative ale moleculelor de ARNr au condus la concluzia că, deși există diferențe în secvența lor nucleotidică, se păstrează un înalt grad de conservare a structurii secundare și terțiare, pe parcursul evoluției. Secvența nucleotidică, atât a unității 16S, cât și a unității 23S, prezintă regiuni cu un înalt grad de conservare, precum și regiuni distinctive.

Tabel 2: Numărul și poziția genelor în operonul rrn (Krawiec și Riley, 1990)

Organismul	*Numărul locilor rrn cu linkage 16S-23S-5S*	*Numărul locilor rrn cu alt linkage sau linkage necunoscut*
Anabaena sp, tulpina PCC 7120		2
Bacillus subtilis	10	
Clostridium perfringens		9
Escherichia coli	7	
Haemophilus influenzae		6
Leptospira interrogans		2:23S 2:16S 1:5S
Mycobacterium bovis	< 2	
Mycobacterium intracellularae	1	
Mycobacterium leprae	1	
Mycobacterium lepraemurium	1	
Mycobacterium phlei	2	
Mycobacterium smegmatis	2	
Mycobacterium tuberculosis	1	
Mycobacterium capricolum	1	
Mycobacterium capricolum subsp. mycoides		2
Mycoplasma gallisepticum	1	1:23S-5S 1:16S
Mycoplasma hypopneumoniae		1:16S-23S1:5S

Organismul	***Numărul locilor rrn cu linkage 16S-23S-5S***	***Numărul locilor rrn cu alt linkage sau linkage necunoscut***
Pirellula marina		2:23S 2:16S
Pseudomonas aeruginosa	4	
Salmonella typhimurium	7	
Streptomyces amibofaciens	4	
Streptomyces coelicolor A_3	6	
Streptomyces lividans	TK21	6
Vibrio harvei	23S-16S-5S	
Thermus thermophylus		2: 23S-5S 2:16S

ARN ribozomal este universal distribuit, având cea mai mare parte a structurii primare constantă, ceea ce îi conferă funcționalitate constantă. Aceste proprietați fac ca moleculele de ARN ribozomal să fie considerate "ceasuri" moleculare relevante în studiile taxonomice, filogenetice și epidemiologice.

Studiul comparativ al moleculei de ARN ribozomal la diferite nivele evolutive și modelul structural al acesteia (fig.7) evidențiază un număr mic de adiții și/sau deleții în structura nucleotidică, localizate în câteva regiuni specifice.

1.3.4. OPERONII ARNt

Secvențele ADNt pot exista la *E. coli* ca loci care codifică o singură specie de ARNt, sau ca operoni care codifică atât ARNt cât și o varietate de proteine sau ARNr. Au fost cartați toți locii care codifică pentru cele 46 specii de ARNt, cunoscute la *E.coli*. Cele 79 gene ARNt sunt organizate în 41 operoni, larg dispersați în cromozomul bacterian.

La *B.subtilis,* secvențele ARNt sunt localizate în operonul *rrn* sau sunt organizate în clustere, în trei regiuni genomice distincte.

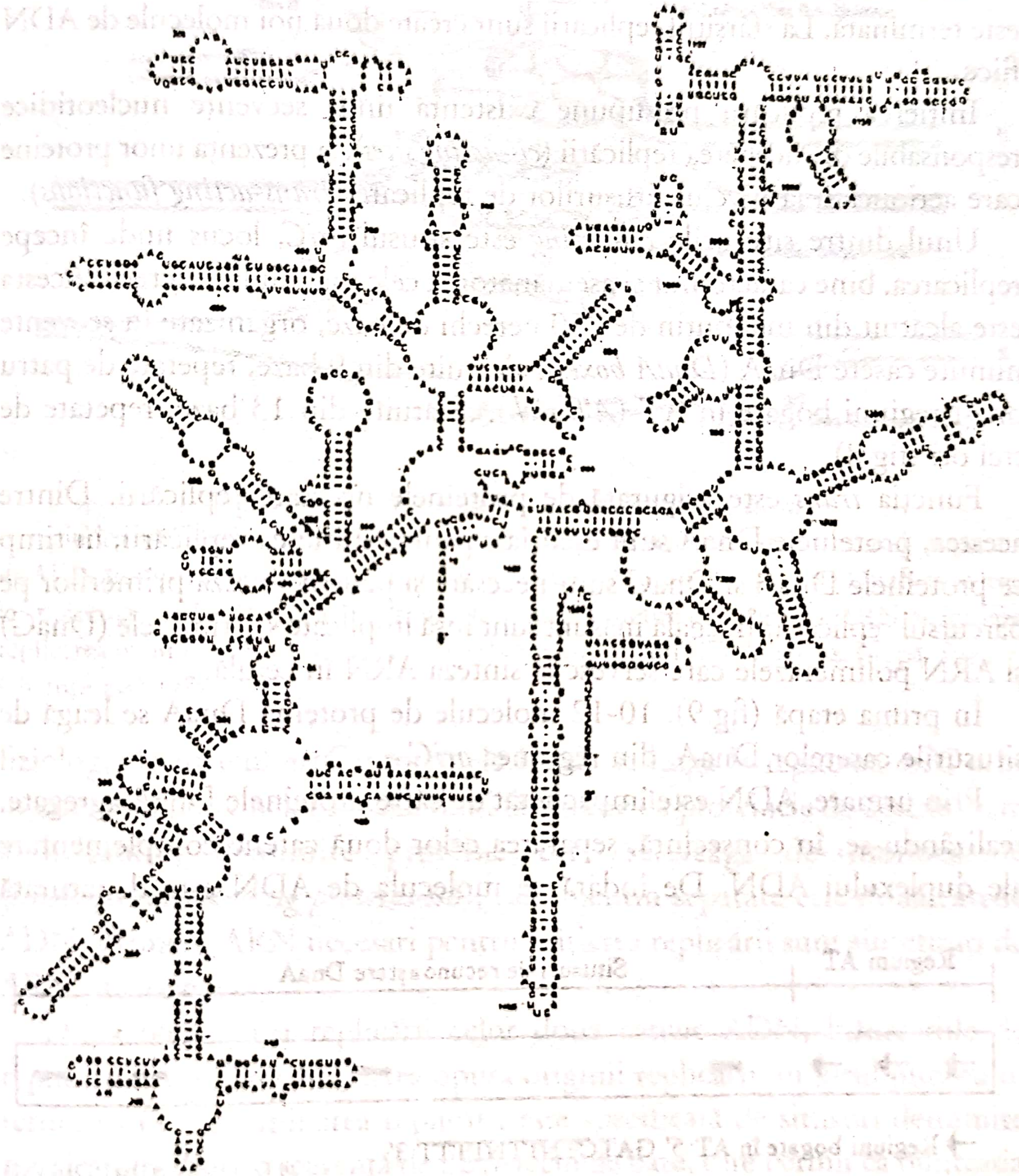


Fig.7 — Structura primară și secundară a ARN ribozomal
(după Malhotra și Harvey,1994)

1.4. REPLICAREA CROMOZOMULUI BACTERIAN

Replicarea cromozomului bacterian este inițiată într-un situs unic numit originea replicarii (*oriC*) și continuă în ambele direcții (replicare bidirecțională). Cele două bifurcații de replicare înaintează de-a lungul moleculei circulare de ADN până se întâlnesc în punctul T și replicarea este terminată. La sfârșitul replicării sunt create două noi molecule de ADN fiice.

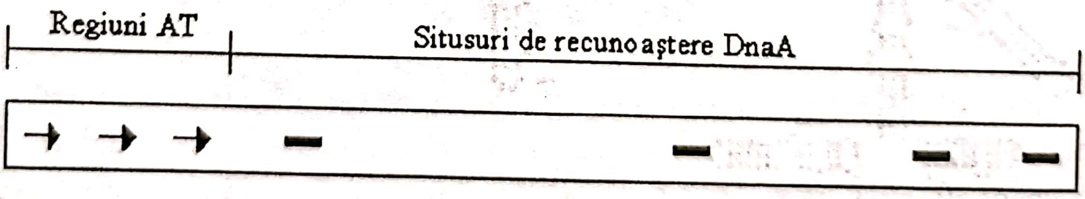
Inițierea replicării presupune existența unor secvențe nucleotidice responsabile de începerea replicării (*cis-acting sites*), și prezența unor proteine care acționează la nivelul situsurilor de replicare (*trans-acting functions*).

Unul dintre situsurile *cis-acting* este situsul *oriC*, locus unde începe replicarea, bine caracterizat și asemănător la cele mai multe bacterii. Acesta este alcătuit din mai puțin de 250 perechi de baze, organizate în secvențe numite casete DnaA (*DnaA boxes*), alcătuite din 9 baze, repetate de patru ori și regiuni bogate în AT (*AT-rich*), alcătuite din 13 baze, repetate de trei ori (fig.8).

Funcția *trans* este asigurată de proteinele necesare replicării. Dintre acestea, proteinele DnaA sunt esențiale pentru inițierea replicării, în timp ce proteinele DnaB și DnaC sunt necesare și pentru sinteza primerilor pe parcursul replicării. În egală măsură sunt însă implicate și primazele (DnaG) și ARN polimerazele care servesc la sinteza ARN în celulă.

În prima etapă (fig.9), 10-12 molecule de proteină DnaA se leagă de situsurile casetelor DnaA, din regiunea *oriC*.

Prin urmare, ADN este împachetat de către proteinele DnaA agregate, realizându-se, în consecință, separarea celor două catene complementare ale duplexului ADN. De îndată ce molecula de ADN este denaturată



→ **Regiuni bogate în AT: 5' GATCTNTTNTTTT 3'**

▬ **Caseta DnaA: 5'TTATCCACA 3'**

Fig. 8 — Structura regiunii ***oriC*** la *E. coli*.

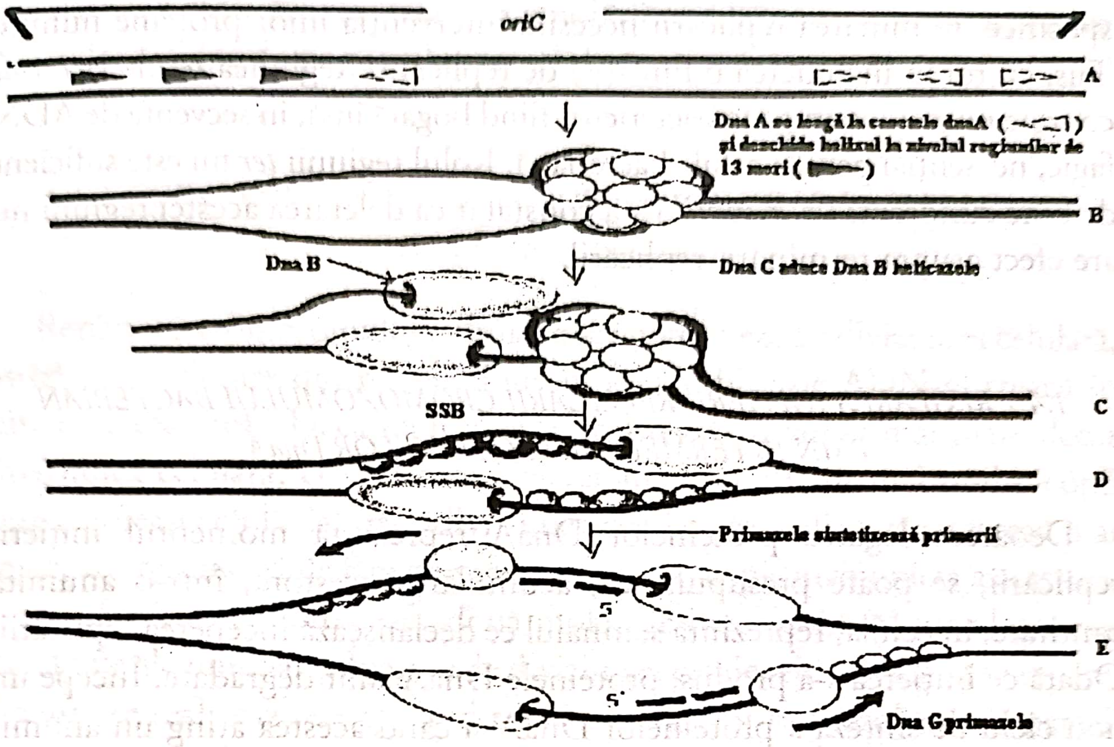

oriC
A
Dna A se leagă la casetele dnaA ( )
şi deschide helixul la nivelul regiunilor de 13 meri ( )
B
Dna B
Dna C aduce Dna B helicazele
C
SSB
D
Primazele sintetizează primerii
5'
E
5'
Dna G primazele

Fig. 9— Inițierea replicării cromozomului la ***E.coli***
A: regiunea *oriC*; B: Proteinele DnaA se leagă la originea replicării, împachetând molecula de ADN în jurul ei însăși și deschizând helixul; C: DnaC ajută helicazele DnaB să se lege la molecula de ADN; D si E: Primazele DnaG sintetizează primerii ARN și inițiază replicarea în ambele direcții; Proteinele SSB mențin helixul ADN deschis. (după Snyder, Champness1997)

fiziologic la nivelul *oriC*, proteinele DnaB se leagă la regiunea *oriC* prin intermediul proteinelor DnaC, fiind favorizate de proteinele de destabilizare a helixului, denumite proteine care se leagă de monocatene (*single-strand-binding proteins-ssb*), care mențin separate cele două catene ADN. Primerii ARN necesari pentru inițierea replicării sunt sintetizați de ARN primaze.

După terminarea replicării celor două catene ADN, bifurcațiile de replicare se întâlnesc în partea opusă originii replicării, în jurul punctului terminus (T). Terminarea replicării este specificată de situsuri denumite *ter*, alcătuite dintr-o secvență de 22 perechi de baze, care permit ca bifurcația de replicare să treacă numai într-o direcție. La *E.coli* au fost identificate două astfel de regiuni, desemnate *terA* și *terB*, fiecare bifurcație de replicare trecând printr-un locus *ter* și oprindu-se în celălalt. Pe lângă secvențe specifice, terminarea replicării necesită intervenția unor proteine numite Tus, cu rol în închiderea bifurcației de replicare. Regiunea *ter* de la *E.coli* conține numai câteva gene bacteriene, fiind bogată însă, în secvențe de ADN fagic, neesențial pentru celula bacteriană. Rolul regiunii *ter* nu este suficient de bine cunoscut. La *B.subtilis* s-a constatat că deletarea acestei regiuni nu are efect asupra terminării replicării.

1.4.1 REGLAREA INIȚIERII REPLICĂRII CROMOZOMULUI BACTERIAN PRIN INTERMEDIUL PROTEINELOR DnaA.

Deoarece legarea proteinelor DnaA reprezintă momentul inițierii replicării, se poate presupune că, acumularea acestora, într-o anumită cantitate, în celulă, reprezintă semnalul ce declanșează începerea replicării. Odată ce inițierea s-a produs, proteinele DnaA sunt degradate. Începe un nou ciclu de sinteză a proteinelor DnaA și când acestea ating un anumit nivel cantitativ, un nou ciclu de replicare este inițiat. Dacă aceasta ar fi singura explicație, atunci concentrația de proteine DnaA ar fi proporțională cu rata de creștere celulară. Experiențele au arătat însă că, în momentul inițierii, concentrația de proteine DnaA este aceeași, în toate celulele, indiferent de rata lor de creștere. Prin urmare, se poate presupune intervenția și a altor factori în acest proces.

Metilarea poate avea un rol esențial în reglarea inițierii replicării, prin întârzierea începerii unui nou ciclu de replicare, în regiunea *oriC*. Deoxiadenozin-metilazele (Dam) metilează cele două baze A din secvența GATC/CTAG, prezentă în 11 cópii în regiunea *oriC*. Metilarea nucleotidului se face numai după încorporare și, prin urmare, noul lanț sintetizat este temporar nemetilat. Imediat după ce a avut loc inițierea replicării, secvența GATC/CTAG din regiunea *oriC* va fi hemimetilată. Această regiune va fi legată de membrana celulară prin intermediul unei proteine numită proteina A de sechestrare (SeqA), fenomen care o face inaptă pentru un nou ciclu de replicare și o protejează de metilazele Dam. Această ipoteză este susținută de constatarea că secvența GATC/CTAG, din regiunea *oriC*, și din regiunea promotorului genei *dnaA*, rămâne hemimetilată mult mai mult decât secvențele similare, aflate în alte regiuni ale cromozomului. În plus, creșterea cantității de metilaze Dam în celulă, conduce la inițierea prematură a replicării, ca urmare a metilării rapide a secvențelor respective și a eliberării lor de pe membrana celulară.

1.4.2. COORDONAREA REPLICĂRII CROMOZOMULUI BACTERIAN CU DIVIZIUNEA CELULARĂ.

Replicarea cromozomului trebuie să se coordoneze cu diviziunea celulară, astfel încât, fiecare dintre cele două molecule fiice de ADN să treacă în câte o celulă fiică. Dacă replicarea se realizează cu viteză mai mare decât diviziunea celulară, cromozomul bacterian se va afla în mai multe cópii într-o aceeași celulă, iar dacă diviziunea celulară se realizează cu viteză mai mare, vor rezulta celule fără cromozom sau cu o cópie incompletă a acestuia.

La sfârșitul replicării, cele două molecule fiice de ADN sunt legate ca două zale ale unui lanț. Înainte de diviziunea celulei ele trebuie să se separe. Aceasta se realizează cu ajutorul topoizomerazelor sau rezolvarea separării lor se poate realiza printr-un mecanism de recombinare.

În final, cele două molecule separate de ADN vor segrega în cele două celule fiice, rezultate prin diviziune, fenomen numit **partiție**. Mecanismul separării celor două molecule în celulele fiice nu este bine cunoscut, un oarecare rol se presupune că îl are membrana celulară și/sau peretele celular care diferențiază structuri speciale de tip **mezosom**.

Au fost emise două ipoteze care încearcă să explice coordonarea replicării cromozomului cu diviziunea celulară. Conform uneia dintre ele, celula asteaptă un oarecare timp, după inițierea replicării, pentru a începe diviziunea. Probabil, un produs generat în timpul procesului de inițiere a replicării pune în mișcare mecanismul de diviziune.

Conform celei de-a doua ipoteze, celula începe să se dividă imediat ce cromozomul a fost complet replicat. Semnalul care anunță sfârșitul unui ciclu de replicare nu a fost identificat.

Experiențele efectuate pe celule bacteriene, în diferite condiții de creștere, au definit timpul necesar replicării cromozomului în corelație cu ciclul celular. Dacă se notează cu *I* intervalul de timp de la ultimul ciclu de replicare până la inițierea unei noi replicări, cu *C* timpul necesar pentru o replicare completă și cu *D* timpul de la terminarea replicării până la începerea diviziunii celulare, se poate constata că la bacteriile cu viteză mică de creștere, *I* este de 70 minute, *C* este de 40 minute, iar *D* este de 20 minute. Când bacteriile sunt trecute într-un mediu propice, ele se divid mai repede. Intervalele *C* și *D* rămân de aceeași lungime, în timp ce *I* se scurtează. Prin urmare, indiferent de rata de creștere, *C* și *D* rămân aproape constante. Se modifică *I*, care de fapt este timpul de generație, adică timpul necesar unei celule pentru a crește și a se divide (fig.10).

În celulele cu un timp de generație mic, *I* poate deveni mai mic decât *C*, un nou ciclu de replicare va începe înainte ca cel anterior să se fi terminat și, prin urmare, cantitatea de ADN în celulele cu creștere rapidă este mai

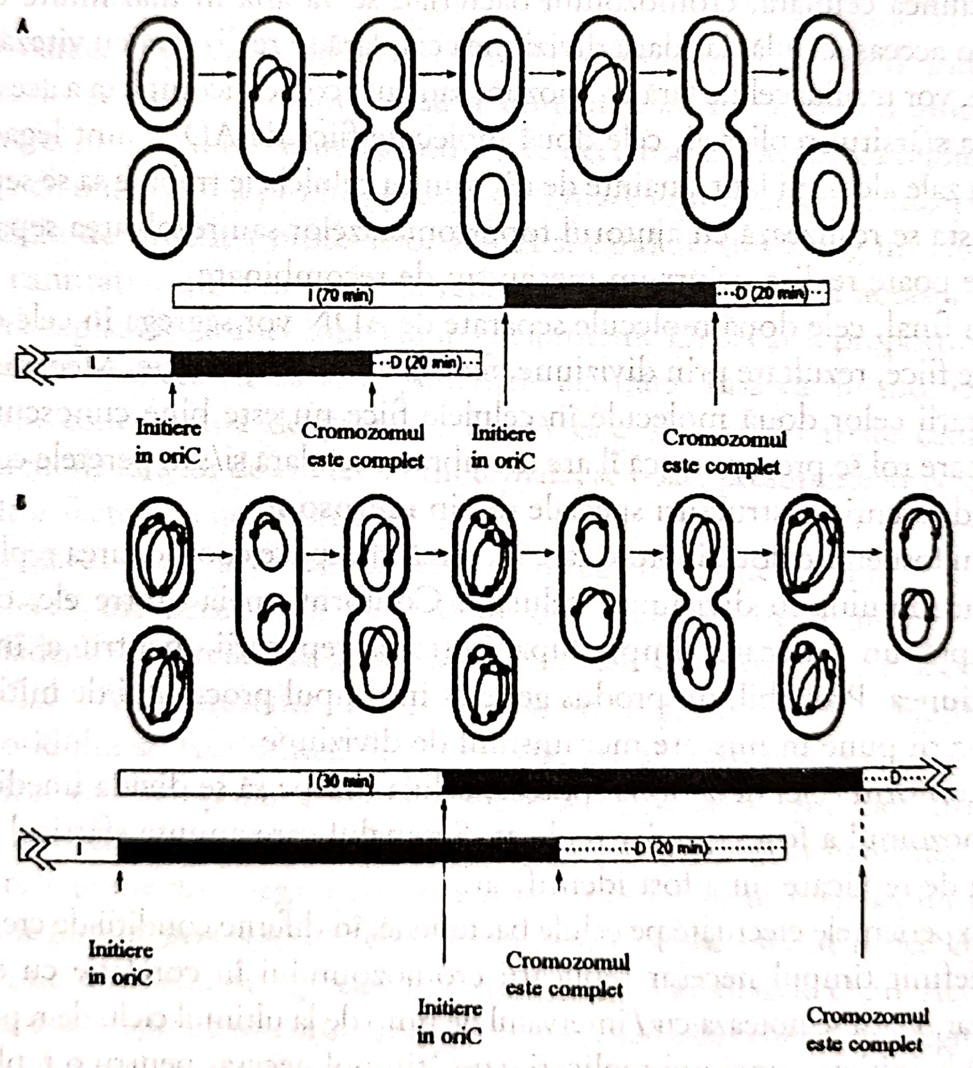

A
I (70 min)
D (20 min)
I
D (20 min)
Initiere in oriC
Cromozomul este complet
Initiere in oriC
Cromozomul este complet
B
I (30 min)
D
I
D (20 min)
Initiere in oriC
Cromozomul este complet
Initiere in oriC
Cromozomul este complet

Fig.10 — Corelarea replicării cromozomului bacterian cu ciclul celular (după Snyder și Champness, 1997)

mare decât în celulele cu creștere lentă. Tot așa se explică existența în mai multe cópii a genelor învecinate regiunii *oriC.* Indiferent de tipul de creștere, timpul necesar pentru replicarea și separarea moleculelor fiice este constant și egal cu 60 minute.

1.4.3. ROLUL MEMBRANEI CELULARE BACTERIENE ȘI AL MEZOSOMULUI ÎN PROCESUL DE REPLICARE

Membrana celulară bacteriană are o structura tipică și conține în principal fosfolipide și proteine. Prin excepție, membrana micoplasmelor exprimă un procent mare de fosfolipide, numite steroli, cu rol în stabilizarea membranei, iar membrana arhebacteriilor, este bogată în acizi grași saturați (fără lipide). În anumite porțiuni, membrana celulară bacteriană se pliază, formând niște structuri sub formă de buzunărașe, către interiorul citoplasmei, denumite **mezosomi** (fig.11). Aceste structuri predomină la bacteriile gram-pozitive, iar în cadrul bacteriilor gram-negative sunt greu distinctibile, din cauza mărimii lor relativ mici.

Cromozomul bacterian prezintă un punct de atașare la membrana celulară, atașarea reclamând sinteza proteinică. Unele date atestă că situsul de atașare la membrana celulară corespunde unei regiuni din cromozomul bacterian bogată în secvențe A-T.

Membrana celulei bacteriene asigură numeroase funcții legate de: transportul nutrienților, procesarea și sinteza acestora, secreția sau eliberarea produșilor de metabolism precum și a unor enzime și toxine

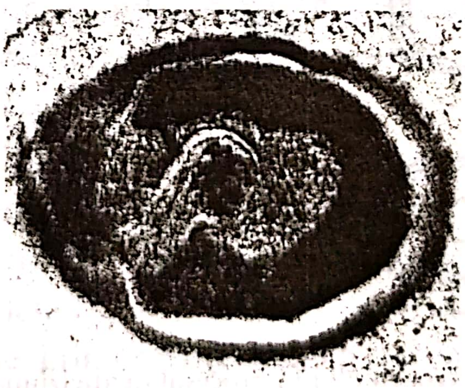


Fig.11 — Imaginea electrono-microscopică a mezosomului bacterian (original).

bacteriene, în mediul extracelular. Se presupune că mezosomii au rol în creșterea suprafeței membranei bacteriene, astfel că aceasta dispune de mai mult spațiu pentru realizarea funțiilor proprii. Rolul membranei celulare bacteriene în reglarea inițierii replicării a fost mult controversat. Se pare că membrana celulară îndeplinește funcția de fus mitotic pentru separarea celor două molecule fiice de ADN după replicare și că funcția mezosomului este legată de călăuzirea acestor molecule de ADN către cele două celule fiice (fig.12 A și B)

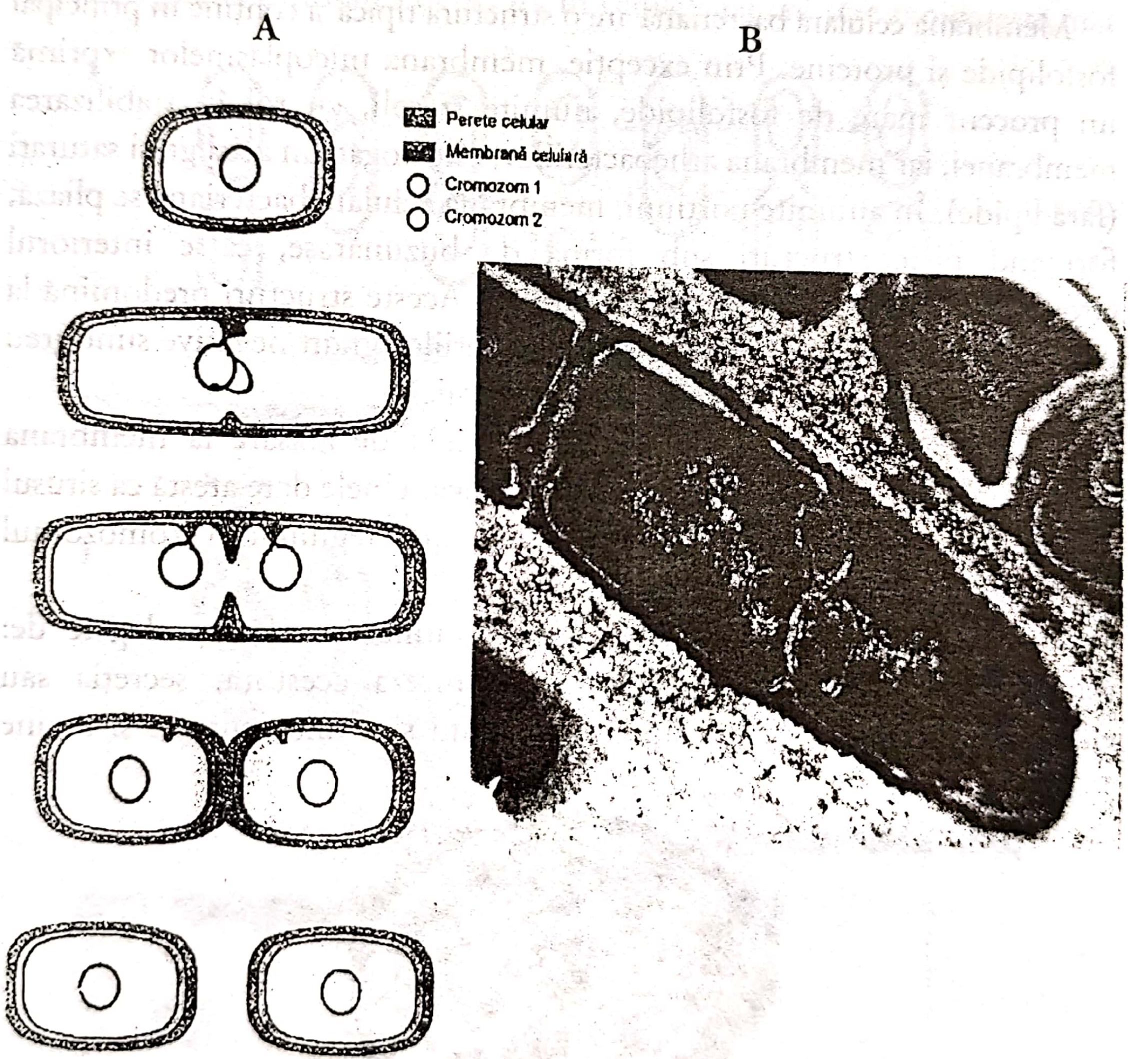


Fig.12 A — Implicarea mezozomului în procesul de diviziune (Talaro și Talaro, 1993)
B: Imagine de microscopie electronică a procesului de diviziune celulară bacteriană în care se remarcă și diviziunea mezosomului la ***Bacillus subtilis*** (original)

1.5. DINAMICA GENOMULUI BACTERIAN

1.5.1. REARANJAMENTELE CROMOZOMALE

Cromozomul bacterian este supus rearanjărilor consecutive recombinărilor la nivelul secvențelor repetitive și/sau recombinărilor specifice de situs. Unele dintre aceste reorganizări sunt stabile, cu o rată de reversie similară celei a mutațiilor punctiforme, altele sunt reversibile, cu o frecvență de 10^{-3}-10^{-1}.

1.5.1.1. Amplificările sunt duplicări în tandem ale genelor, observate la multe bacterii. Secvențele amplificate variază ca lungime între 11 și 30 kpb, ele putând fi întâlnite în 80 până la 100 cópii. Tulpinile sălbatice, capabile să genereze mutante, ca urmare a amplificărilor, conțin o singură cópie a elementului amplificabil, cu o mărime care variază între 5 și 25kpb, flancată de secvențe repetate de 1-2kpb. În celulele mutante, secvențele de ADN amplificat (ADS) se detectează ușor, prin electroforeza în gel de agaroză a fragmentelor de restricție enzimatică. La *Streptomyces fradiae* au fost identificate mai mult de 500 cópii ale unei regiuni amplificabile de 8.3kpb, secvență care este flancată de două cópii ale unei regiuni repetate direct, de 2.2kpb. La alte specii de *Streptomyces* au fost identificate patru structuri supuse amplificării a căror lungime variază între 5.8 și 24.8kpb. Secvența de 8.0kpb, flancată de o regiune repetată de 0.8kpb, responsabilă de resistența la spectinomicină, a fost identificată la unele mutante, în 200-300 cópii.

Stabilitatea amplificărilor este variabilă. Când elementul amplificat este responsabil de rezistența la antibiotice, el persistă în forma vegetativă, chiar dacă presiunea selectivă a antibioticului încetează. La un nou ciclu de viață, pornind de la faza de spor, cópiile supranumerare ale regiunii genomice amplificate sunt eliminate.

1.5.1.2. Delețiile pot altera produsul unei gene sau pattern-ul expresiei genice, pot modifica structura proteinelor membranare, precum și a factorilor de virulență și se produc în urma recombinării între două secvențe direct repetate. Prin urmare, delețiile apar între secvențe de inserție, între gene ARNr, etc. Analiza de restricție a unor tulpini de *B.subtilis* evidențiază prezența a 9 operoni *rrn*, în loc de 10, ca urmare a unor recombinări, la nivelul operonilor ADNr, care au condus la pierderea unui operon și a materialului genetic dintre cei doi operoni recombinanți.

1.5.1.3. Variația de fază și diversitatea antigenică este expresia unor rearanjări care implică inversia unor segmente genetice, care se soldează cu modificarea expresiei genice, adesea numită variație de fază. Se cunosc patru tipuri de sisteme care pot modifica expresia genica, cu efect în structura antigenelor de suprafața.

Inversii de tip Hin. Variația de fază la *Salmonella* este consecința acțiunii *Hin recombinazei*, o enzimă specifică de situs, care are capacitatea de a inversa un segment de 980 pb, de la nivelul structurilor de reglare a două gene care controlează structura flagelilor, având drept consecință exprimarea alternativă a acestora. Sisteme similare au fost semnalate pentru genele care codifică pilina la *Moraxella bovis* și variația de fază flagelară la *C.coli*.

Alte inversii specifice de situs. Sistemul care guvernează variația de fază a fimbriilor de tip I la *E.coli* constă în inversia unui fragment de 314pb care afectează orientarea promotorului genei *fimA*. Secvența situsului de recombinare *fim* este diferită de aceea a situsului *hin*, de la *Salmonella*, având mai degrabă omologie înaltă cu situsul de integrare al fagului λ.

Caseta de activare/inactivare. Sistemul casetei de activare/ inactivare a fost evidențiat la *Saccharomyces cerevisiae*, ca având rol de a determina o variație proteinică, ca urmare a rearanjărilor prin transpoziție de la nivelul unui grup de gene silențioase, conducând la activarea acestora și la schimbarea tipului de sexualitate. Același mecanism este utilizat de *Neisseria gonorrhoeae*, pentru exprimarea genelor responsabile de sinteza pilinei.

Variația și translația. Sistemul este descris în exprimarea proteinelor PII, de suprafață, la *N.gonorrhoeae*. Secvența nucleotidică a genelor ce codifică pentru peptidele *leader* conține 7 până la 28 de cópii în tandem ale unei regiuni de 5 nucleotide. Adițiile și/sau delețiile de la nivelul acestor zone repetitive conduc la modificarea cadrului de citire și, în consecință, la apariția unei variații în exprimarea proteinei PII.

Cromozomul bacterian este o structură complexă protein-polinucleotidică, dinamică, capabilă să răspundă la modificările impuse de mediu. Gene specifice pot fi active sau inactive, uneori ca urmare a modificărilor în structura primară sau secundară a moleculei de ADN.

Detectarea structurii stabile a cromozomului bacterian precum și identificarea diferitelor evenimente genetice, care au loc la nivelul moleculei de ADN sunt posibile prin dezvoltarea metodelor de analiză genetică.

1.6. CROMOZOMI LINEARI

Unele bacterii, precum *Borrelia burgdorferi*, *B.hermsii*, *Streptomyces lividans*, *S.ambofaciens* etc. pot avea cromozomi lineari.

Cromozomii lineari și plasmidele lineare nu erau cunoscute la procariote până recent, când au fost descoperite atât la bacteriile gram negative (G-), la cele gram pozitive (G+), cât și la spirochete. S-a considerat mult timp, că la bacterii, nu ar fi existat decât molecule de ADN circular, însă electroforeza în câmp pulsator, a permis decelarea formelor lineare de cele circulare. La *Borrelia*, există un plasmid linear cu capete covalent închise în *hairpin-loop* (buclă în ac de păr). La *Streptomyces*, bacterie G+ filamentoasă, plasmidele lineare au atașate covalent proteine la fiecare capăt. De asemenea, se știe că la bacterii, unii repliconi pot avea izomeri lineari și circulari.

Primul cromozom linear a fost descifrat în 1989, la spirocheta *B.burgdorferi*, apoi astfel de cromozomi au fost descriși și la streptomicete. Plasmidele lineare bacteriene au fost descrise inițial la *S.rochei* în 1979, fiind apoi depistate la alte 10 specii de *Streptomyceta*, ca și la *Nocardia*. Plasmide lineare există la toți membri genului *Borrelia*. Un deosebit interes a suscitat descifrarea structurii moleculare a acestor plasmide, a mecanismului lor de replicare, precum și identificarea unor eventuale trăsături comune cu alte molecule de ADN linear de tip „clasic".

1.6.1. ORIGINEA ADN LINEAR

Originea moleculelor de ADN linear la bacterii a ridicat o serie de întrebări. Acest tip de structuri lineare sunt frecvent întâlnite la eucariote. Ipotezele care explică originea lor sunt variate. Se presupune, fie că ADN linear ar descinde dintr-un ancestor comun, fie că a avut loc o evoluție convergentă în realizarea unor funcții similare, fie că a apărut prin transfer direct de la un organism la altul. Există și posibilitatea ca ADN linear să fi evoluat din bacteriofagi.

Ca avantaj evolutiv putem spune că integrarea cromozomală a invertronilor și conjugarea sunt simplificate de structura lineară, deoarece aceste procese necesită intermediari lineari. În plus, existența unui tip de element conjugativ comun atât la celulele procariote cât și la cele eucariote, poate permite o comunicare genetică între acestea.

2. EREDITATEA EXTRACROMOZOMALĂ BACTERIANĂ – PLASMIDE BACTERIENE

Plasmidele sunt molecule de ADN bicatenar, circulare, dotate cu funcție de replicare autonomă și transmise stabil de-a lungul generațiilor. Deși se replică autonom, plasmidele au nevoie, pentru replicare, de factori codificați de gazdă. Sunt prezente în majoritatea speciilor bacteriene, dar nu în toate tulpinile unei specii. În general, plasmidele naturale, prezente în celulele procariote nu sunt indispensabile vieții gazdei.

Plasmidele au dimensiuni cuprinse în domeniul de la 1kpb la peste 200kpb. Evaluarea dimensiunii ADN plasmidic se poate face prin electroforeză în gel de agaroză, când distanța de migrare a diferitelor specii ADN este invers proporțională cu logaritmul greutăților lor moleculare. Plasmide cu greutate moleculară cunoscută pot fi folosite ca standarde pentru a aprecia dimensiunea unui plasmid prin electroforeză în gel de agaroză. De exemplu, se comercializează ca marker de dimensiune un amestec de plasmide de mărime cunoscută (kpb) în conformație superhelicală (*plasmid supercoiled ladder*): 2.07, 2.97, 3.99, 5.01, 6.03, 7.05, 8.07, 10.10, 12.14, 14.17, 16.21. Concentrațiile gelurilor variază de la 0,25 la 1,5% agaroză într-un tampon standard de electroforeză. Plasmidele cu dimensiuni cuprinse între 10 și 15kpb migrează la nivelul benzii ADN cromozomal în gel Tris-borat, în vreme ce în geluri Tris-acetat, plasmidele de 20 – 23kpb pot fi mascate de banda de ADN cromozomal rezidual. Electroforeza în gel de agaroză se folosește în scopuri variate, de la simpla vizualizare a unui plasmid într-o celulă bacteriană, până la studii epidemiologice bazate pe analiza profilurilor plasmidice.

2.1. STRUCTURA PLASMIDELOR BACTERIENE

Majoritatea plasmidelor sunt molecule de ADN circulare închise covalent (ccc, pentru *covalently closed circular*). Plasmidele bacteriene sunt prezente *in vivo* preponderent într-o structură caracteristică, compactă, în care dublul helix prezintă spiralizări superhelicale. Acest caracter structural se menține și în timpul manoperelor de izolare din celule și stă la baza multor metode de separare a ADN plasmidic de cel cromozomal. Unele plasmide pot fi prezente atât ca ADN dublu-catenar, cât și ca ADN monocatenar. Plasmidele monocatenare sunt de fapt intermediari de replicare și au fost izolate din bacterii gram-pozitive (*B.subtilis*, *Staphylococcus aureus*).

Au fost descrise și plasmide liniare; acestea au fost identificate în celule de *S.rochei*, precum și la *B.burgdorferi* și *B.coriaceae*. Structura plasmidului liniar de 16kpb de la *B.burgdorferi* a fost caracterizată în detaliu. Ambele capete ale moleculei de ADN sunt legate covalent, formând bucle în ac de păr (*hairpin-loop*) terminale, monocatenare, perfect palindromice, bogate în AT. Un tip diferit de plasmide liniare este întâlnit la numeroase specii de *Streptomyces*. Aceste plasmide, cu dimensiuni între 9 – 600kpb, au o proteină terminală atașată covalent la fiecare capăt 5', precum și secvențe ITR (*Inverted Terminal Repeat*). Cercetătorul japonez Sakaguchi a propus ca toate aceste elemente genetice mobile, cu replicare autonomă, și care au proteine atașate covalent la capete, precum și secvențe ITR, să poarte numele de **invertroni**.

2.2. FUNCȚII CODIFICATE DE PLASMIDE

Determinanții genetici purtați de un plasmid pot fi împărțiți, convențional, în două clase principale: unii care sunt esențiali pentru autonomia replicativă a plasmidului și alții care specifică funcții exprimate în fenotipul gazdei.

Termenul de **plasmide criptice** este atribuit plasmidelor care nu se manifestă prin efecte detectabile fenotipic. Majoritatea plasmidelor bacteriene sunt suportul unei largi varietăți de caractere (sau determinanți) care conferă bacteriei gazdă o mare suplețe genetică, precum și proprietăți de importanță economică sau medicală. Ele permit fie o mai bună adaptare la un mediu defavorabil sau fluctuant, fie menținerea în anumite gazde, fie o competiție victorioasă (prin avantaje de creștere) cu alte microorganisme din aceeași specie sau din specii diferite.

Informație bogată există în principal pentru trei tipuri de plasmide izolate din tulpini *E.coli*: plasmide F, R și Col.

Plasmidele Col conferă celulei capacitatea de a produce bacteriocine-proteine secretate în mediu - care distrug alte tulpini bacteriene înrudite, lipsite de plasmidul Col. Bacteriocinele produse de *E.coli* se numesc colicine. Prezența plasmidului Col conferă tulpinii colicinogene rezistență la propria sa colicină. Aceste plasmide codifică pentru factori de virulență. Ele sunt printre cele mai studiate, datorită importanței în patologia infecțioasă umană sau veterinară, alături de plasmidele R, care conferă tulpinii gazdă rezistență la antibiotice. Plasmide R au fost izolate pentru prima dată dintr-o tulpina de *Shigella dysenteriae*, de către cercetatorul japonez T.Watanabe.

Plasmidele F (factor de fertilitate) se pot autotransfera într-o celulă lipsită de plasmid F (F^-) și pot media transferul genelor cromozomale dintr-o celulă care poartă un plasmid F (F^+), într-o altă celulă F^-.

Alte tipuri de plasmide.

Plantele infectate cu *Agrobacterium tumefaciens* prezintă tumori cunoscute sub numele de „*crown gall*" (gale în formă de coroană). Tulpina de *Agrobacterium* este purtătoarea unui tip particular de **plasmid T_I** (*tumour inducing*) care este patogenic. În acest caz, patogenitatea este asociată cu transferul unei părți specifice din molecula de ADN plasmidic, în celulele plantelor. Acest fenomen are o importanță deosebită pentru manipularea genetică la plante.

De asemenea, specii ale genului *Rhizobium* pot infecta plante, dar în acest caz este vorba mai mult de o simbioză decât de patogenie. Aceste bacterii, formează noduli pe rădăcinile plantelor leguminoase. În aceste condiții, bacteriile sunt capabile să fixeze azotul pe care îl oferă plantei. Genele necesare pentru formarea nodulilor și fixarea azotului se găsesc pe un plasmid, cunoscut sub numele de **plasmidul R**.

Anumite specii din genul *Pseudomonas* pot utiliza mai multe tipuri de compuși organici ca sursă de carbon. În anumite condiții, aceste bacterii folosesc substanțe aparent toxice, cum ar fi toluenul, camforul și octanul. Plasmidele care conferă această plasticitate metabolică, sunt cunoscute sub numele de **plasmide degradative**. Ele au o contribuție importantă în îndepărtarea poluanților din mediul înconjurător, putând degrada hidrocarburi, ierbicide și diferite tipuri de detergenți. Alte tipuri de **plasmide** sunt cele **care conferă rezistență la ionii metalici toxici**. Originea lor nu este cunoscută, ele fiind identificate la bacterii ce trăiesc în medii bogate în astfel de ioni.

2.3. PROPRIETĂȚI GENERALE ALE PLASMIDELOR

Replicarea autonomă a unui plasmid nu trebuie să fie mai rapidă decât replicarea cromozomului bacteriei gazdă (contrar cazului unui virus) și nu trebuie să fie mai înceată, deoarece consecința este diluarea sa în cursul creșterii populației bacteriene. Un mecanism de control strict, codificat de plasmid asigură simultan replicarea, numărul de cópii (existența unui număr fix de cópii plasmidice per cromozom) și repartiția echilibrată a cópiilor plasmidice în celulele-fiice în timpul diviziunii celulare. Incompatibilitatea plasmidelor este una dintre consecințele acestui mecanism de control.

2.3.1. REPLICAREA PLASMIDELOR

Ca și în cazul cromozomului, la toate plasmidele studiate s-a demonstrat existența unei regiuni specifice, originea replicării (*oriV*), la nivelul căreia este inițiată replicarea. Majoritatea plasmidelor prezintă o singură origine replicativă. Se cunosc câteva plasmide care au două sau mai multe origini de replicare alternative.

Unele plasmide încep replicarea prin desfacerea celor două catene ADN la nivelul regiunii *ori*, creându-se o structură care are forma literei grecești theta (θ). Mecanismul theta este prevalent (Fig. 13 A și B).

De la origine, replicarea progresează fie unidirecțional - replicarea se termină atunci când bifurcația de replicare revine la origine (pentru majoritatea plasmidelor de dimensiuni mici), fie bidirecțional - replicarea se termină atunci când bifurcațiile de replicare se întâlnesc undeva pe molecula ADN în partea opusă originii (la unele plasmide mari).

Într-un alt tip de replicare, după modelul cercului rotativ, una dintre catene (catena plus) este crestată la nivelul regiunii *ori* și capătul 3'OH

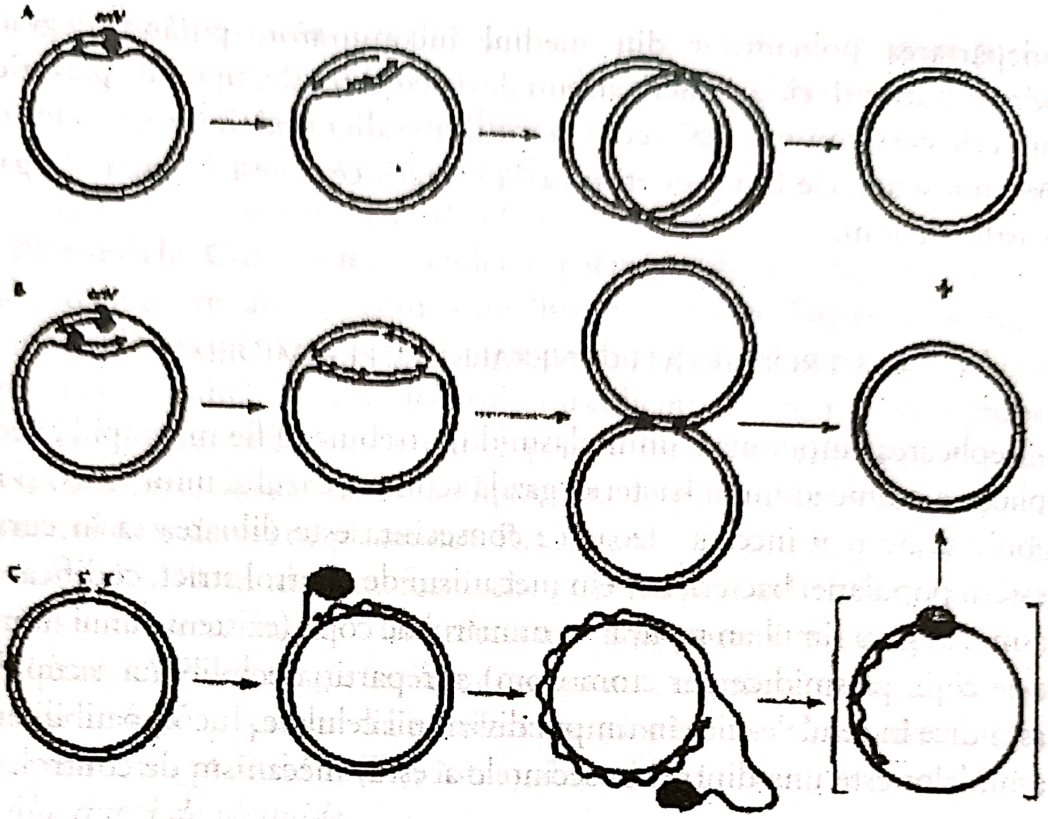


Fig.13 — Cele mai frecvente scheme de replicare întâlnite la plasmide. A) replicare unidirecțională. B) replicare bidirecțională. C) replicare după modelul cercului (inelului) rotativ (după Snyder și Champness, 1997).

funcționează ca primer al replicării. Crestătura este inițiată de o proteină, care rămâne legată covalent de capătul 5', în timp ce extensia capătului 3' deplasează catena plus. Capetele catenei deplasate sunt ligate de aceeași proteină, iar replicarea este inițiată la nivelul unor situsuri specifice (origini ale catenei minus), pentru a genera o nouă formă replicativă dublu-catenară (Fig.13C). Dacă aceste origini de replicare nu funcționează bine în anumite gazde, se vor acumula intermediari de replicare, monocatenari, circulari închiși. Aceștia reprezintă plasmidele monocatenare descrise și identificate preponderent la bacterii gram-pozitive.

Toate genele implicate în replicare sunt localizate în regiunea *ori*, într-un perimetru restrâns în jurul originii. Genele din regiunea *ori* determină adesea și alte proprietăți ale unui plasmid (spectrul de gazdă, numărul de cópii, fenomenul de incompatibilitate).

Replicarea plasmidelor liniare. Sinteza ADN necesită prezența unui primer, care este în mod normal generat de către o ARN polimerază, după atașarea acesteia la molecula de ADN. Îndepărtarea primerului ARN de la capătul 3', lasă molecula-fiică nereplicată, în regiunea terminala 3'. Această problemă este rezolvată printr-un mecanism de replicare bazat pe proprietățile speciale ale telomerelor. Plasmidele lineare de la *Borrelia* au secvențe asemănătoare telomerelor la capetele lor. Cele două catene de ADN sunt legate covalent la capete (Fig. 14).

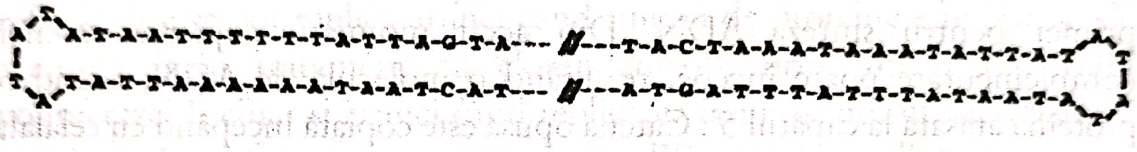

A-T-A-A-T-T-T-T-T-T-A-T-T-A-G-T-A--- //---T-A-C-T-A-A-A-T-A-A-A-T-A-T-T-A-T
T-A-T-T-A-A-A-A-A-A-T-A-A-T-C-A-T--- //---A-T-G-A-T-T-T-A-T-T-T-A-T-A-A-T-A

Fig.14 — Capetele plasmidului liniar de la ***Borrelia*** sunt legate covalent (după Dale, 1998).

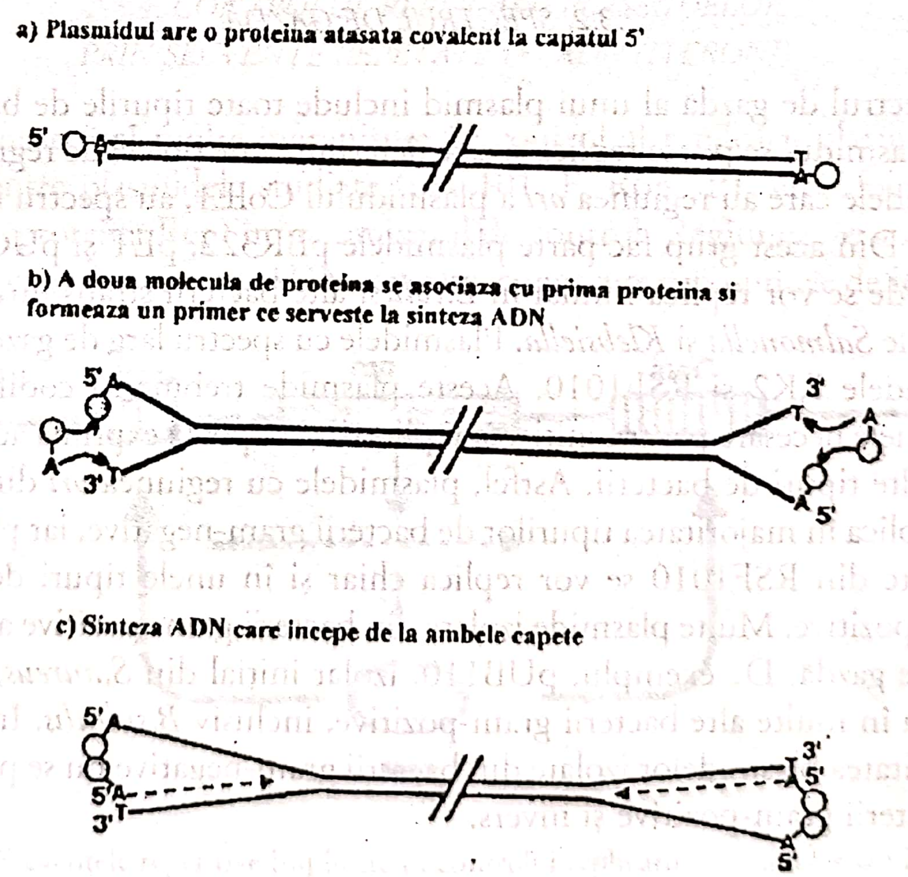

a) Plasmidul are o proteina atasata covalent la capatul 5'
5'
A
T
b) A doua molecula de proteina se asociaza cu prima proteina si formeaza un primer ce serveste la sinteza ADN
5'
3'
A
T
3'
5'
c) Sinteza ADN care incepe de la ambele capete
5'
5'
3'
3'
5'
5'

Fig. 15 — Modelul de replicare al plasmidelor liniare de la ***Streptomyces*** (după Dale, 1998).

Se presupune că ARN polimeraza are disponibilitatea de a continua replicarea, trecând peste capetele covalent închise pe cealaltă catenă, evitându-se astfel pierderile de secvențe informaționale.

Plasmidele liniare de la *Streptomyces* rezolvă problema pe altă cale, prin primarea replicării ADN, utilizând o proteină care este atașată covalent la capătul 5' al fiecărei catene de ADN. Inițierea replicării începe prin asocierea acestei proteine cu o a doua moleculă de proteină, care are atașat covalent un nucleotid. Baza atașată formează legături de hidrogen cu capătul 3' al catenei complementare și furnizează un capăt 3'OH, care acționează ca primer pentru sinteza ADN. Din acest moment, copierea catenei complementare poate începe, rezultând o moleculă de ADN, având o proteină atașată la capătul 5'. Catena opusă este copiată începând cu celalalt capăt al plasmidului (Fig. 15).

2.3.2. SPECTRUL DE GAZDĂ

Spectrul de gazdă al unui plasmid include toate tipurile de bacterii în care plasmidul se poate replica și este determinat de obicei de regiunea *ori*. Plasmidele care au regiunea *ori* a plasmidului ColE1, au spectru îngust de gazdă. Din acest grup fac parte plasmidele pBR322, pET și pUC. Aceste plasmide se vor replica numai în *E.coli* și alte bacterii strâns înrudite din genurile *Salmonella* și *Klebsiella*. Plasmidele cu spectru larg de gazdă includ plasmidele RK2 și RSF1010. Aceste plasmide trebuie să codifice toate proteinele necesare pentru inițierea replicării și să poată exprima aceste gene în multe tipuri de bacterii. Astfel, plasmidele cu regiunea *ori* din RK2 se vor replica în majoritatea tipurilor de bacterii gram-negative, iar plasmidele derivate din RSF1010 se vor replica chiar și în unele tipuri de bacterii gram-pozitive. Multe plasmide izolate din bacterii gram-pozitive au spectru larg de gazdă. De exemplu, pUB110, izolat inițial din *S.aureus*, se poate replica în multe alte bacterii gram-pozitive, inclusiv *B.subtilis*. In general, majoritatea plasmidelor izolate din bacterii gram-negative nu se pot replica în bacterii gram-pozitive și invers.

2.3.3. NUMĂRUL DE CÓPII PLASMIDICE PER CELULĂ

Fiecare plasmid este menținut într-un număr caracteristic de cópii per celulă. Există, în general, o relație inversă între dimensiunile unui plasmid și numărul său de cópii per celulă. Plasmidele prezente în număr mic de cópii prezintă un mod de replicare **stringent** (replicarea plasmidelor este cuplată cu replicarea cromozomului bacterian). Replicarea lor are nevoie de sinteza de proteine din celula gazdă și de activitatea ADN polimerazei III. Plasmidele prezente în număr mare de cópii au un mod de replicare **relaxat**. Ele se pot replica atunci când sinteza de proteine este oprită (de exemplu, prin tratament cu cloramfenicol), prin intervenția ADN polimerazei I, chiar și atunci când replicarea cromozomului bacterian s-a terminat. Acest fenomen se numeste **amplificare plasmidică**.

2.3.4. CONTROLUL REPLICĂRII PLASMIDELOR PRIN SECVENȚE REPETATE DE ADN (ITERONI)

Se cunosc mai multe mecanisme de control al replicării plasmidelor. Multe dintre plasmidele studiate (pSC101, F, R6K, P1, etc.) folosesc o proteina (proteina Rep) în mecanismul de control. Regiunea *ori* a acestor plasmide conține secvențe ADN repetate, cunoscute sub numele de **iteroni**.

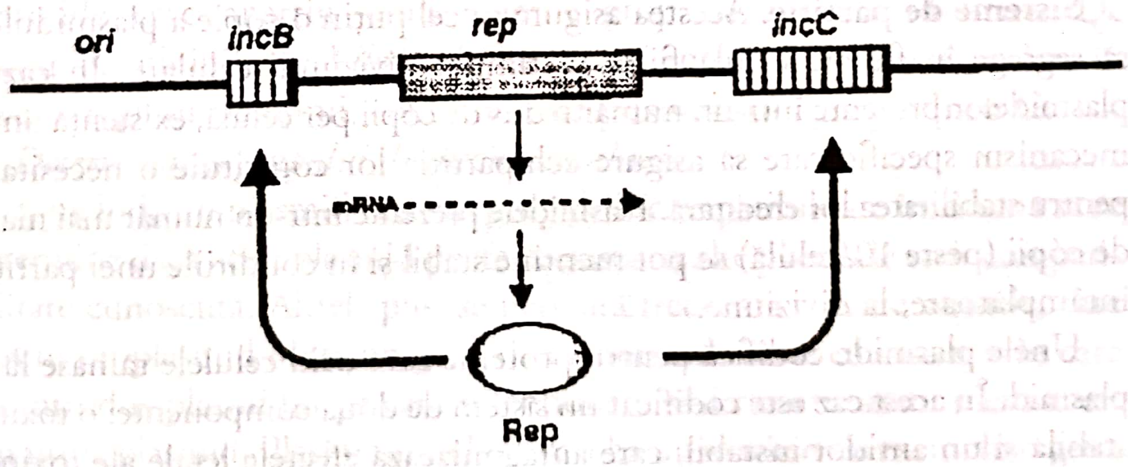


Fig.16 — Secvențele repetitive implicate în controlul replicării plasmidelor sau iteronii. Regiunile ***incB*** și ***incC***, constau în repetiții multiple ale unei secvențe scurte. Proteina Rep, care este necesară pentru replicare, se leagă atât de ***incB*** cât și de ***incC*** (după Dale, 1998).

Lungimea lor este cuprinsă între 17 - 22pb și există în 3 - 7 cópii în regiunea originii, dar și în alte locuri pe plasmid. Proteina Rep, necesară pentru inițierea replicării, se leagă și de secvențele iteroni, ceea ce, la concentrație mare, poate conduce la asocierea a două molecule plasmidice la nivelul regiunii *ori*, împiedicând replicarea (Fig. 16).

Prin acest mecanism, replicarea depinde atât de concentrația proteinei Rep, cât și de concentrația plasmidului însuși.

2.3.5. MECANISME DE ÎMPIEDICARE A PIERDERII PLASMIDELOR

Celulele care pierd un plasmid în timpul diviziunii celulare se consideră „vindecate“ (*cured*) de plasmid. Există diferite mecanisme naturale pentru evitarea pierderii plasmidelor.

Rezoluția plasmidelor multimere. Posibilitatea pierderii unui plasmid în timpul diviziunii celulare este sporită dacă plasmidele formează multimeri în timpul replicării. Un multimer constă din cópii individuale ale moleculei plasmidului, legate unele de altele. Multe plasmide au sisteme de recombinare situs-specifice care distrug multimerii. Aceste sisteme asigură recombinarea între situsuri specifice de pe plasmid în cazul în care acest situs apare mai mult de o singură dată într-o moleculă. Recombinarea are ca efect rezolvarea multimerilor, în molecule separate.

Sisteme de partiție. Acestea asigură ca cel puțin o cópie a plasmidului să segrege în fiecare celulă fiică, în timpul diviziunii celulare. În cazul plasmidelor prezente într-un număr redus de cópii per celulă, existența unui mecanism specific care să asigure echipartiția lor constituie o necesitate pentru stabilitatea lor ereditară. Plasmidele prezente într-un număr mai mare de cópii (peste 10/celulă) se pot menține stabil și în condițiile unei partiții întâmplătoare, la diviziune.

Unele plasmide codifică pentru proteine care ucid celulele rămase fără plasmid. În acest caz este codificat un sistem de două componente: o toxină stabilă și un antidot instabil, care antagonizează efectele letale ale toxinei prin formarea unui complex. Astfel de funcții au fost descrise pentru plasmidul F, plasmidul R1 și profagul P1, replicat ca un plasmid. Proteina toxică a plasmidului F este Ccd, a plasmidului R1 este Hok, iar în cazul profagului P1 este Doc. Ele acționează prin mecanisme distincte și ucid celulele imediat după ce acestea au pierdut plasmidul. Celulele care au pierdut plasmidul nu mai sintetizează nici proteina toxică, nici antidotul. Deoarece antidotul este instabil, în scurt timp în celulă se acumulează numai proteina toxică și celulele sunt omorâte. Aceste sisteme fac celulele dependente de plasmidul dobândit și împiedică acumularea celulelor care l-au pierdut.

2.3.6. FENOMENUL DE INCOMPATIBILITATE

Se spune că două plasmide sunt incompatibile atunci când ele nu pot coexista stabil în aceeași celulă, în absența presiunii selective. Două plasmide care au același mecanism de control al replicării vor fi incompatibile. Sistemul de control al replicării nu va recunoaște cele două plasmide ca diferite și, astfel, oricare dintre ele poate fi selectat pentru a fi replicat, la întâmplare.

La *E.coli* se cunosc 25 grupe naturale de incompatibilitate (Inc). Acestea sunt desemnate prin litere și/sau cifre (de exemplu, IncI 1). ADN plasmidelor care aparțin aceluiași grup de incompatibilitate au un înalt grad de omologie. Plasmidele anumitor grupuri de incompatibilitate au o specificitate de gazdă foarte scăzută (de exemplu, IncP) și pot să se replice în bacterii care aparțin unui mare număr de genuri, îndepărtate filogenetic. Totodată, anumite genuri sau specii bacteriene nu pot menține stabil decât plasmide care aparțin unui anumit grup de incompatibilitate. De exemplu, tulpinile de *Vibrio cholerae*, rezistente la antibiotice, izolate în diverse regiuni ale lumii, conțin numai plasmide din grupul Inc6-C.

Determinarea grupului de incompatibilitate.

A include un plasmid într-un grup de incompatibilitate înseamnă să se determine dacă acest plasmid poate coexista cu alte plasmide cu incompatibilitate cunoscută. Altfel spus, se măsoară frecvența cu care celulele, care conțin un plasmid dintr-un grup de incompatibilitate cunoscut și în care s-a introdus plasmidul pe care intenționăm să-l caracterizăm, pierd acest din urmă plasmid. Plasmidul trebuie să aibă un marker, de exemplu o genă de rezistență la antibiotic. Se determină rata de pierdere a plasmidului. Celulele care conțin plasmidele sunt cultivate în mediu complet, dar fără antibiotic. Periodic se iau probe din cultură, se fac diluții și se cultivă pe mediu solid fără antibiotic. După incubarea plăcilor, se replică și se incubează pe mediu cu antibiotic. Procentul de colonii care nu au bacterii rezistente este procentul de bacterii care au pierdut plasmidul prin cultivare.

2.4. DETECTAREA ȘI IZOLAREA PLASMIDELOR

Principiul **metodei lizei alcaline**. Tratamentul cu alcalii al lizatelor celulare conduce la separarea, sau denaturarea, catenelor ADN. Creșterea concentrației saline produce precipitarea ADN cromozomal, care are dimensiuni foarte mari și este asociat cu proteine. Plasmidele mici nu precipită rapid la concentrații mari de sare și rămân în supernatant. Deoarece sunt structuri închise covalent, catenele nu se pot separa complet când ADN este denaturat. Încolacirea celor două catene permite renaturarea rapidă, atunci când condițiile denaturante au fost îndepărtate. Prin contrast, cromozomul se renaturează lent.

Purificarea cu CsCl-EtBr. Aceasta metodă se bazează pe faptul că moleculele ADN circulare închise covalent leagă mai puțină bromură de etidiu (EtBr) decât moleculele liniare sau cele circulare deschise. Bromura de etidiu intercalată face ADN mai puțin dens în soluții saline grele (CsCl). De aceea, dacă ADN este amestecat cu o soluție de CsCl și EtBr și centrifugat pentru a se obține un gradient al concentrației CsCl, molecula de ADN plasmidic, conformația ccc va forma o bandă mai jos, acolo unde soluția este mai densă.

Aceste metode dau rezultate bune cu plasmide care au un număr mare de cópii și nu sunt foarte mari. Plasmidele mari sunt mai susceptibile la rupere în timpul manipulării. În general, se vor comporta asemănător ADN cromozomal. De aceea, pentru detectarea plasmidelor mari se alege separarea lor de cromozom direct prin electroforeză în gel de agaroză a unor lizate celulare brute.

2.5. TRANSFERUL DE MATERIAL GENETIC LA BACTERII

Bacteriile fiind organisme haploide (conțin un singur cromozom), remanierea prin recombinare a materialului genetic are nevoie de transfer de material genetic de la o tulpină donoare la o tulpină receptoare. Transferul pe orizontală are loc în general între tulpini genotipic diferite, dar care aparțin aceleiași specii bacteriene sau între specii strâns înrudite. Cu toate acestea, în ultimii ani, mai multe studii au evidențiat chiar și posibilitatea schimburilor genetice între tulpini gram-pozitive și tulpini gram-negative.

La bacterii s-a evidențiat existența a trei mecanisme distincte de transfer genetic: transformare, transducție și conjugare.

În cazul procesului de **transformare**, ADN provenit de la bacteria donoare este preluat de o bacterie receptoare aflată în stare de competență. Transformarea a fost prima formă de transfer a materialului genetic descoperită la bacterii. Astfel, ADN eliberat dintr-o celulă S (virulentă) de *Diplococcus pneumoniae*, inactivată prin caldură, a determinat transformarea în bacterie virulentă a unei celule vii de tip R (nevirulentă) din aceeași specie. Demonstrarea că principiul transformant este molecula de ADN a constituit prima dovadă directă că ADN este materialul ereditar al celulelor.

Unele specii bacteriene sunt natural competente. Fenomenul are loc numai într-o anumită etapă a ciclului celular, atunci când bacteriile au atins densități mari și intră în faza staționară. Transformarea naturală se realizează astfel: un fragment de ADN bicatenar, provenit dintr-o celulă care a suferit liză, intră în altă celulă bacteriană sub formă de ADN monocatenar, liniar. Celulele natural competente pot fi transformate cu ADN cromozomal liniar și nu pot fi transformate cu ADN plasmidic, deoarece, în acest din urmă caz, menținerea stabilă este asigurată numai în celulele care au primit cel puțin o moleculă integră de ADN plasmidic, care se poate circulariza și replica autonom.

Bacteriile care nu sunt natural competente pot fi transformate după un tratament chimic sau prin electroporare. Metoda standard pentru a permeabiliza *E.coli* implică tratament cu ioni de calciu. Celulele devenite competente prin tratament cu calciu, preiau atât ADN monocatenar cât și ADN dublu-catenar, mai ales plasmidic.

În cazul transferului prin **transducție**, un bacteriofag poate încorpora fragmente de ADN bacterian, pe care le transmite bacteriilor infectate ulterior. Transducția poate fi **generalizată**, când teoretic, orice regiune a cromozomului bacterian poate fi transferată de la o bacterie la alta de către un fag transductor, respectiv **specializată**, când pot fi transduse numai anumite gene, localizate în imediata vecinătate a situsului de atașare a unui **fag lizogen.**

În timpul ciclului de viață lizogen, fagii nu se multiplică, ci molecula lor de ADN se integrează în cromozomul gazdei sau este menținută ca un plasmid a cărui replicare se corelează cu replicarea materialului genetic al celulei. ADN fagic integrat în cromozom este denumit **profag** și bacteria care conține un profag este o **bacterie lizogenă**. Unii fagi sunt integrați în regiuni codificatoare ale cromozomului bacterian, adesea gene care codifică pentru molecule ARNt. De exemplu, fagul P22 de la *Salmonella* se integrează într-o genă ce codifică pentru ARNt^{Tre} (Treonină), fagul P4 de la *E.coli* și fagul HPc1 de la *H.influenzae* se integrează într-o genă ce codifică pentru ARNt^{Leu} (Leucină).

Au fost evidențiate numeroase cazuri de profagi care poartă gene pentru toxine sau alți factori de virulență necesari bacteriilor patogene pe care le lizogenizează. De exemplu, bacteriile care reprezintă agentul etiologic al difteriei, scarlatinei, botulismului, tetanosului și holerei au nevoie de fagi lizogeni pentru virulență. Tulpinile patogene de *Corynebacterium diphtheriae* diferă de tulpinile nepatogene deoarece sunt lizogene pentru fagul β. Profagul β poartă gena *tox*, pentru toxina difterică. Această genă este transcrisă numai când *C.diphtheriae* infectează gazda eucariotă sau în condiții care reconstituie acest mediu.

În cazul transferului prin **conjugare**, ADN bacterian pătrunde într-o bacterie receptoare în timpul contactului direct între celula donoare și celula receptoare. În funcție de capacitatea lor de a promova transfer prin conjugare, plasmidele au fost împărțite în conjugative și neconjugative. Plasmidele conjugative au în general dimensiuni mari, de peste 20×10^6 daltoni, fapt explicat de cantitatea relativ mare de informație genetică necesară pentru asigurarea capacității de conjugare. Un plasmid conjugativ poate realiza fie doar propriul sau transfer, fie asigură și transferul altui material genetic, de natură plasmidică sau cromozomală.

Atunci când materialul transferat nu este asociat stabil cu plasmidul conjugativ, procesul se numește **mobilizare**. Procesul de mobilizare are caracter specific, un plasmid conjugativ fiind capabil să mobilizeze numai anumite plasmide.

Clasificarea plasmidelor conjugative.

Plasmidele bacteriene au diferite tipuri de sisteme de transfer, codificate de genele *tra*. Produșii genelor *tra* acționează în *trans* și pot acționa și asupra unui alt plasmid aflat în aceeași celulă. Pentru transfer este necesar și un situs *oriT*, element cu acțiune în *cis*. De exemplu, secvența *oriT* a plasmidului F are mai puțin de 300pb, conține secvențe repetate inversat și o regiune bogată în perechi de baze AT.

Plasmidele conjugative sunt clasificate pe baza sistemului de transfer și, totodată, a grupului de incompatibilitate (Inc) căruia îi aparțin. Plasmidele F folosesc un sistem de transfer cunoscut ca sistemul Tra al plasmidelor IncF, iar plasmidul RP4 folosește sistemul Tra al plasmidelor IncP. În ciuda acestei nomenclaturi, care leagă sistemul de transfer de grupul de incompatibilitate, din punct de vedere genetic nu există o astfel de relație. Genele pentru funcțiile de replicare, respectiv de partiție ale plasmidului și genele de transfer sunt localizate în regiuni diferite ale plasmidului. Cu toate acestea, există un grad înalt de corelare între tipul de sistem de transfer și grupul Inc. Unele proteine codificate de gene de transfer plasmidice pot inhiba intrarea plasmidelor cu aceleași funcții Tra. Dacă genele *tra* nu s-ar corela cu grupul Inc, un plasmid ar putea să se transfere într-o celulă care are deja un plasmid aparținând aceluiași grup de incompatibilitate și, în consecință, unul din plasmide ar fi pierdut.

Multe plasmide au sisteme de transfer care le permite să se transfere între specii neînrudite. Acestea se numesc **plasmide de promiscuitate** (*promiscuous plasmids*) și includ plasmidele IncW, reprezentate de R388, plasmidele IncP, reprezentate de RP4 și plasmidele IncN, reprezentate de pKM101. Plasmidele IncP se pot transfera sau pot mobiliza alte plasmide din *E.coli* în orice bacterie gram-negativă. Studii recente au arătat că ele se pot transfera cu frecvență joasă în cianobacterii, bacterii gram-pozitive și chiar în celule de plante.

Transferul interspecii are consecințe importante pentru folosirea antibioticelor în terapia umană și veterinară, precum și în zootehnie, deoarece majoritatea plasmidelor de promiscuitate sunt plasmide R.

Mecanismul transferului ADN prin conjugare la bacterii gram-negative. În timpul conjugării, se transferă numai o catenă a plasmidului. Cele două monocatene servesc ca matriță pentru replicare și producerea unor molecule de ADN plasmidic dublu-catenar, identice cu plasmidul originar. Celula donoare produce un pilus, codificat de plasmid. Prin intermediul acestui pilus stabilește contactul cu o potențială celulă receptoare care nu conține plasmidul. Retractarea pilusului aduce celulele în contact direct și la nivelul membranelor se formează un por. La nivelul originii de transfer -*oriT*- se crestează una din catene (*single-stranded nick*). Situsul *oriT* este diferit de originea de replicare - *oriV*. Capătul 5' al unei monocatene plasmidice este transferat în celula receptoare prin por. În timpul transferului, plasmidul este replicat în celula donoare, sinteza ADN fiind inițiată de la capătul 3'-OH al crestăturii *oriT*. Replicarea din celula receptoare are loc printr-un mecanism diferit, cu primeri ARN.

Sisteme de transfer prin conjugare la bacterii gram-pozitive.

Plasmide conjugative au fost identificate în numeroase specii gram-pozitive: *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* și *Streptomyces*. Mecanismul de transfer este diferit de cel caracterizat la bacteriile gram-negative. Un caz particular îl constituie tulpinile speciei *Enterococcus faecalis*, în care au fost izolate o clasă aparte de plasmide conjugative: plasmidele care răspund la feromoni (*sex pheromone plasmids*). Feromonii sunt peptide mici, care stimulează transferul unui anumit plasmid. Plasmidele conjugative cu răspuns la feromoni nu codifică pentru peptidele hidrofobe scurte, ci doar pentru funcțiile conjugative induse de aceste semnale. Celulele care conțin deja plasmidul nu mai exprimă peptidul specific acestuia, dar continuă să secrete alte peptide care stimulează agregarea cu celule care conțin alte tipuri de plasmide.

Plasmide mobilizabile.

Pentru a fi mobilizabil, este suficient ca un plasmid să conțină numai situsul *oriT* al unui plasmid conjugativ. Astfel de plasmide nu există în natură, ci au fost construite în laborator. Plasmidele mobilizabile, naturale, conțin gene *mob*, pentru transferul ADN și o secvență unică *oriT*. Aceste gene sunt localizate într-o regiune numită *mob* și sunt analoge genelor *tra* implicate în transferul plasmidelor conjugative. Produșii lor lărgesc spectrul plasmidelor conjugative care pot mobiliza plasmidul respectiv.

Transferul conjugativ al cromozomului prin intermediul plasmidelor.

Uneori plasmidele se inseră în cromozom. Integrarea plasmidelor în cromozom poate avea loc prin diferite mecanisme, inclusiv prin recombinare între secvențe comune de pe plasmid și de pe cromozom (de exemplu, secvențe de inserție). În situația în care aceste plasmide se transferă, ele asigură transferul liniar și orientat al cromozomului. Bacteriile care pot să-și transfere cromozomul datorită unui plasmid integrat se numesc **tulpini hfr**, adică tulpini cu frecvență înaltă de recombinare (*high-frequency recombination*). O altă modalitate de transfer al unor markeri cromozomali este consecința exciziei aberante a plasmidului integrat în cromozom, astfel încât acesta preia și un segment cromozomal adiacent.

2.6. VECTORI DE CLONARE ȘI DE EXPRESIE PLASMIDICI

Un vector de clonare este o molecula ADN care se poate replica autonom și în care poate fi inserat un alt fragment ADN. Orice ADN inserat într-un vector de clonare se va replica odată cu vectorul, conducând la obținerea unui mare număr de cópii ale insertului respectiv. Proprietățile unui vector plasmidic "ideal" sunt:

1. Să aibă dimensiuni reduse, pentru a putea fi izolat și manipulat cu ușurință, inclusiv introdus în diverse bacterii.
2. Să aibă un număr mare de cópii.
3. Să poarte un marker de selecție ușor detectabil (de exemplu, o genă de rezistență la antibiotice).
4. Să aibă situsuri unice ale unor endonucleaze de restricție, care să permită inserția ADN străin.

2.6.1. VECTORUL DE CLONARE PBR322

Acest vector este un plasmid mic (numai 4360 pb) și are un număr relativ mare de cópii/celulă (16 cópii). Vectorul a fost construit folosind regiunea *ori* din pMB1, un plasmid ColE1- *like*, și două gene de rezistență la antibiotice, tetraciclină și ampicilină (*tet*, respectiv *amp*), care provin din plasmidul pSC101, respectiv transpozonul Tn*3* (Fig. 17).

Plasmidul are câteva situsuri unice pentru endonucleaze de restricție, între care *Bam*HI, *Eco*RI și *Pst*I. Situsul *Bam*HI este la nivelul genei *tet*.

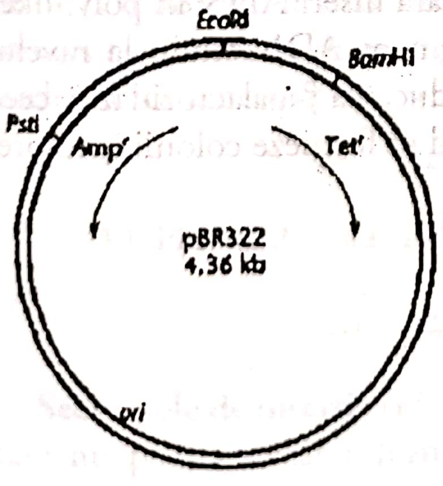


Fig. 17 — Vectorul de clonare plasmidic pBR322. Sunt evidențiate situsuri de restricție unice. Amp^R, rezistența la ampicilină. Tet^R, rezistența la tetraciclină. (după Snyder și Champness, 1997)

Clonarea unui fragment ADN în situsul *Bam*HI, inactivează gena *tet* și bacteriile purtătoare vor fi sensibile la tetraciclină. Aceleași bacterii rămân rezistente la ampicilină, fenotip ușor de detectat prin cultivare pe mediu solid cu antibiotic.

2.6.2. VECTORI DE EXPRESIE

Pot fi folosiți pentru a obține proteine recombinante, prin intermediul bacteriilor. Acești vectori conțin un promotor bacterian puternic și o regiune de inițiere a traducerii. Prototipul vectorilor de expresie este reprezentat de familia de vectori pUC (Fig.18).

Plasmidele pUC sunt foarte mici (2700 pb), au un număr mare de cópii/celulă (30 – 50 cópii) și marker de selecție Amp^{r} (rezistență la ampicilină). Un situs de clonare multiplă (*polylinker*), care constă din secvențe de recunoaștere pentru diferite endonucleaze de restricție, a fost inserat imediat în aval de un promotor puternic (promotorul *lac*). Orice ADN clonat într-unul din situsurile de restricție ale regiunii policlonale va fi transcris din promotorul *lac*, inductibil prin lactoza sau IPTG (izopropiltiogalactozid). Situsul de clonare multiplă este situat într-un fragment al genei *lacZ* din *E.coli*, care codifică pentru β-galactozidază. Localizarea sa nu întrerupe cadrul de citire *lacZ* și, într-o gazdă *E.coli* corespunzătoare, expresia acestui fragment de genă conduce la sinteza enzimei active. Dacă aceste bacterii sunt cultivate pe mediu care are încorporat compusul incolor *X-gal* (5-dibrom-4-clor-3-indolil-β-D-galactozid), hidroliza acestuia va da naștere unui produs insolubil, de culoare albastră. Coloniile *E.coli* care au plasmidul fără insert ADN în polylinker sunt de culoare albastră. Inserția unui fragment ADN străin la nivelul situsului de clonare multiplă împiedică producerea β-galactozidazei, ceea ce face ca bacteriile care conțin acest plasmid să formeze colonii incolore, pe același mediu.

2.6.3. *VECTORI NAVETĂ (SHUTTLE VECTORS)*

Atunci când un vector de clonare plasmidic trebuie să fie transferat dintr-un organism în altul, cu care nu este înrudit, aceeași regiune *ori* nu poate funcționa în ambele organisme. În astfel de situații se folosesc vectori navetă. Un vector navetă are două origini de replicare, fiecare din ele fiind functională în câte un organism. Vectorii navetă trebuie să conțină gene care să permită selecția și care să se exprime în ambele organisme. Unii vectori navetă se pot replica în bacterii gram-pozitive și *E.coli*, în timp ce alți vectori pot fi folosiți în eucariote inferioare sau chiar superioare. De exemplu, plasmidul YEpl3 are originea de replicare a plasmidului 2μm din *Saccharomyces cerevisiae*, precum și regiunea *ori* a lui pBR322. Plasmidul mai conține gena *LEU2*, care se exprimă în drojdie, precum și gena *amp*, care conferă rezistență la ampicilină în *E.coli*. Plasmide navetă, care se replică în celule de mamifere și în *E.coli*, au fost construite având originea de replicare ColE1 și originea de replicare a virusului SV40.

3. ELEMENTE GENETICE TRANSPOZABILE LA BACTERII

Elementele transpozabile sunt definite ca elemente genetice care pot transloca dintr-un replicon în altul (transpoziție intermoleculară) sau într-un alt situs al aceluiași replicon (transpoziție intramoleculară), în lipsa omologiei între segmentele care interacționează și independent de funcțiile de recombinare generalizată ale bacteriei gazdă. Transpoziția poate avea loc pe orice replicon și, pentru un replicon dat, în poziții aleatoare. Pentru anumiți transpozoni, există zone privilegiate de inserție (*hot spot*), care pot corespunde unor regiuni cu conținut ridicat AT și/sau unor secvențe nucleotidice omologe cu extremitățile elementului transpozabil.

3.1. PRINCIPALELE TIPURI DE TRANSPOZONI BACTERIENI

3.1.1. *SECVENTELE DE INSERIE*

Secventele de insertie (IS) sunt elementele transpozabile cele mai simple, care nu poartă decât informația genetică necesară pentru transpoziție.

Componentele esențiale sunt: o genă care codifică pentru o transpozază (*tnp*) și două secvențe terminale repetate, inversate (mai mult sau mai puțin perfecte) (IR), care sunt recunoscute specific de către transpozază (Fig 19A).

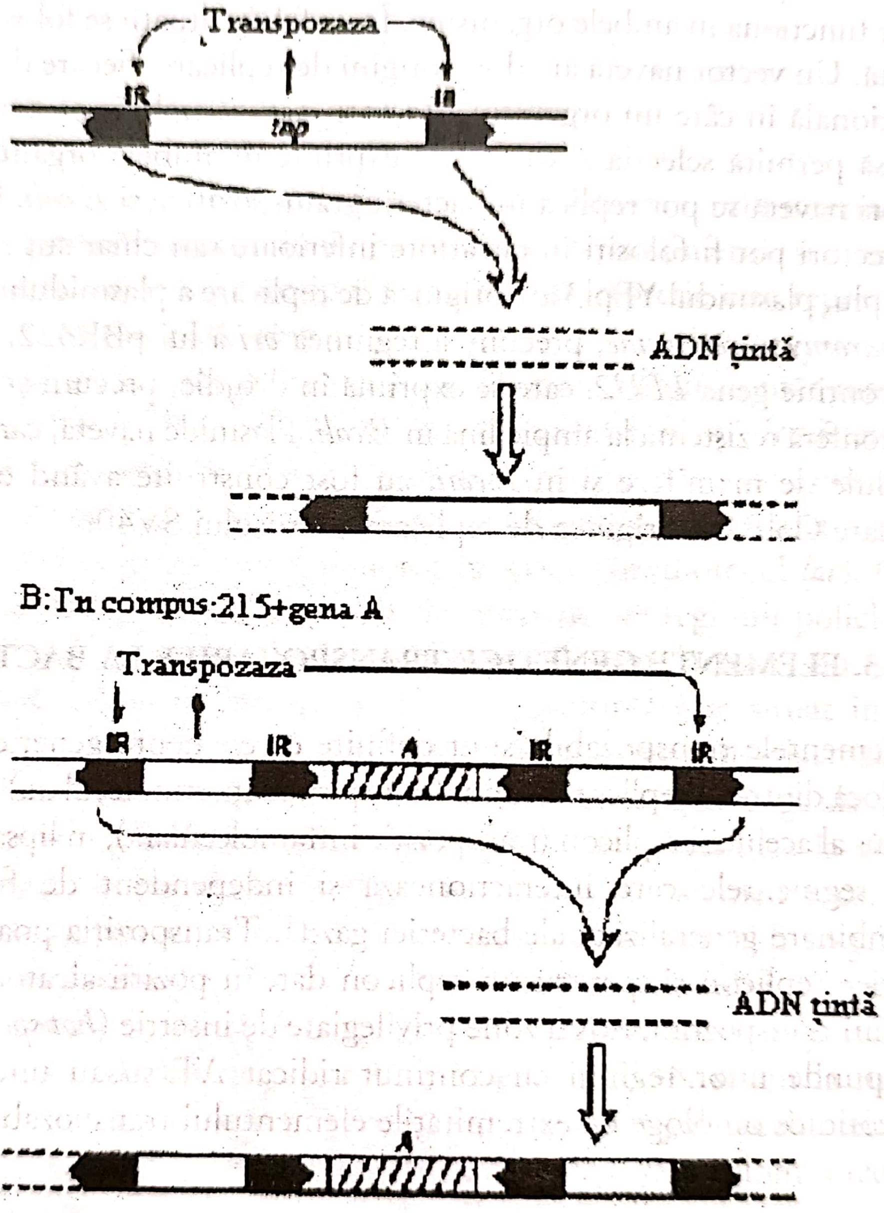

Transpozaza
IR
tnp
IR
ADN țintă
B:Tn compus:215+gena A
Transpozaza
IR
IR
A
IR
IR
ADN țintă
A

Fig. 19 — A-structura unui element IS (secvență de inserție). Acțiunea transpozazei la capătul unui element IS izolat, determină transpoziția sa. B- Două elemente IS de același tip se găsesc în vecinătate în structura ADN. Prin acțiunea transpozazei, are loc transpoziția simultană a acestora, incluzând și segmentul ADN dintre cele două IS (regiunea hașurată). Săgețile indică secvențele repetate inversat (IR) de la capetele elementelor IS, iar liniile punctate reprezintă ADN țintă. (după Snyder și Champness, 1997)

Secvențele de inserție se pot integra în diferite părți din genom, la nivelul unor zone de omologie cu secvențele repetitive. Integrarea lor în ADN țintă generează duplicarea, în orientare directă, a unei secvențe scurte, situată lângă situsul de integrare. Această duplicare este rezultatul inciziilor decalate pe care transpozaza le generează pe cele două catene ale ADN țintă. Dupa integrarea elementului, secvențele de ADN monocatenar sunt reparate.

Elementele IS joacă un rol important în evoluția genetică a microorganismelor. Aceste elemente modifică structuri și funcții genetice, în felurite moduri: pot inactiva gene prin inserția în ORF (*open reading frame*=cadru deschis citirii); pot influența expresia unei gene, când inserția are loc în amonte de aceasta, prin intermediul secvențelor promotor *outward-reading*; pot genera transpozoni compuși; pot funcționa ca secvențe care privilegiază recombinarea.

3.1.2. TRANSPOZONII COMPUȘI

Transpozonii compuși cuplează funcțiile de transpoziție cu alți determinanți genetici. Un transpozon compus este o structură în care, una sau mai multe gene sunt încadrate de două cópii ale unei secvențe de inserție, care pot fi dispuse cu aceeași orientare sau cu orientare inversă (Fig. 19B). Lista transpozonilor compuși identificați și caracterizați se îmbogățește continuu. Întreaga informație genetică necesară translocarii unui transpozon compus în integralitatea sa este conținută în secvențele terminale ale IS. În acest scop, este suficient ca una din cele două IS să sintetizeze o transpozază activă. Inserarea unui transpozon compus provoacă duplicarea unei secvențe ADN scurte, la nivelul ADN țintă. Mărimea secvenței duplicate depinde de IS prezentă la extermitățile transpozonului și este cuprinsă între 8 și 10 pb.

3.1.3. TRANSPOZONII COMPLECȘI

Transpozonii complecși au o structură diferită de transpozonii compuși. Au fost grupați în familii alcătuite din transpozoni cu proprietăți structurale și funcționale similare. Unele din cele mai studiate sunt familia transpozonului Tn*3* și, respectiv, familia transpozonului Tn*21*.

Transpozonul Tn*3*, detectat într-o tulpină de *E.coli*, este un segment ADN de 4957pb, cu extremități de 38pb ce constituie IR. Codifică pentru o β-lactamază de tip TEM-1. Organizarea sa genetică mai cuprinde genele *tnpA* și *tnpR*, ale căror produși sunt o transpozază și, respectiv, o rezolvază. Specific pentru transpoziția intermoleculară a lui Tn*3* este formarea unui cointegrat, produsul translocării transpozonului din repliconul donor pe repliconul receptor, asociată cu duplicarea transpozonului. Această etapă este mediată de transpozază. Rezoluția cointegratului în doi repliconi autonomi, fiecare deținând o cópie a elementului, este realizată de rezolvază și constă într-o recombinare cu specificitate de situs la nivelul situsului de rezoluție internă (SRI) prezent în transpozon. Rezoluția cointegratului poate fi catalizată și de către sistemul de recombinare al gazdei. În ambele cazuri, rezoluția cointegratului produce doi repliconi independenți. Primul este identic repliconului donor, al doilea este o copie a repliconului receptor, ce poartă o cópie Tn*3*.

Inserția transpozonului este asociată, de asemenea, cu duplicarea unei scurte secvențe (5-8 pb) din secvența țintă. Transpozonii grupați în această familie diferă între ei prin genele de rezistență purtate, ca și prin aranjamentul relativ al genelor necesare transpoziției. Toți au însă o caracteristică: prezența unei cópii a unui astfel de transpozon împiedică transpoziția, pe același replicon, a unei alte cópii a transpozonului sau a unui transpozon înrudit. Bazele moleculare ale acestui fenomen, numit imunitate de transpoziție, nu sunt clarificate încă.

3.1.4. BACTERIOFAGII MU ȘI D108

Bacteriofagii Mu și D108 utilizează mecanismul de transpoziție drept mecanism de replicare a genomului fagic în cursul ciclului litic sau ca mecanism de inserție în timpul ciclului lizogenic. Denumirea bacteriofagului Mu reprezintă prescurtarea de la 'mutator', deoarece circa 3% dintre celulele *E.coli* infectate cu acest bacteriofag prezintă mutații ușor de identificat. Genomul fagului Mu măsoară aproximativ 39kpb, are structură liniară, cu terminații variabile provenind din molecula de ADN bacterian anterior infectată. După pătrunderea în celula bacteriană, ADN fagic se inseră în cromozom, în poziții aleatorii. După inducție, nu are loc excizia profagului ci multiplicarea sa printr-un mecanism de transpoziție replicativă, cu formare de cointegrate. Ca o consecință, în diferite situsuri ale cromozomului bacterian apar cópii ale genomului Mu. În cele din urmă, cópiile de ADN profagic sunt excizate din cromozom, în vederea împachetării, care se realizează prin mecanismul 'capului plin'. Enzima implicată în excizie recunoaște secvențe specifice de la capătul denumit prin convenție, capătul stâng al moleculei de ADN fagic, dar taie aproximativ la 150 pb în aval de acest capăt. Procesul de împachetare progresează până ce capul fagului este umplut, ceea ce înseamnă mai mult ADN decât lungimea bacteriofagului Mu. Consecința este includerea de ADN bacterian în noii virioni. Fiecare virion are secvențe diferite de ADN bacterian care flanchează genomul fagic, funcție de locul unde a fost inserat în cromozom.

Există de asemenea, transpozoni care prin caracteristicile lor structurale și funcționale nu aparțin nici uneia din cele trei clase definite anterior. Menționăm numai transpozonii conjugativi, detectați în tulpini care aparțin unor genuri diverse: *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* și *Bacteroides*, de exemplu (vezi subcapitolul 3.4).

3.2. MODELE MOLECULARE PENTRU TRANSPOZIȚIE

Principalele modele de transpoziție sunt transpoziția **conservativă:** translocarea elementului are loc fără replicarea sa și este urmată de pierderea sa din repliconul donor, printr-un mecanism "cut-and-paste", ca în cazul multor elemente IS și transpozoni compuși (Tn*10*, Tn*5*, Tn*9*) și transpoziția **replicativă** (Tn*3* și fagul Mu).

3.2.1. TRANSPOZIȚIE REPLICATIVĂ

Modelul se bazează pe următoarele observații:

1. Ori de câte ori un transpozon Tn*3* se integrează într-un situs, o secvență scurtă din ADN țintă este duplicată. Numărul de baze duplicat este caracteristic fiecărui transpozon (pentru Tn*3*, 5 pb; pentru IS*1*, 9pb).

2. Formarea unui cointegrat, în care ADN donor și ADN țintă au fuzionat și codifică pentru două cópii ale transpozonului, este o etapă intermediară în procesul de transpoziție.

3. Cointegratul format poate fi rezolvat în moleculele ADN donoare și țintă, separate fie prin funcțiile de recombinare ale gazdei, fie de către o rezolvază care realizează recombinarea la nivelul secvențelor interne *res*.

4. După rezolvarea cointegratului ambele molecule au o cópie a transpozonului. Transpozonul nu se deplasează, ci se copiază și noua cópie apare în altă parte.

5. Pentru unii transpozoni, nici transpoziția, nici rezoluția cointegratelor, nu au nevoie de enzimele de recombinare normală sau de omologie extinsă între transpozon și ADN țintă.

3.2.2. TRANSPOZIȚIE CONSERVATIVĂ

Transpozaza face incizii dublu-catenare la capetele transpozonului, îl scoate din ADN donor și, apoi, îl lipește în ADN țintă la nivelul inciziei decalate (*staggered break in target DNA*). Atunci când sunt umplute golurile, o secvență scurtă este duplicată.

3.3. DOVEZI EXPERIMENTALE ALE TRANSPOZIȚIEI

3.3.1. TESTUL DE VALIDARE A TRANSPOZIȚIEI PRIN CONJUGARE (MATING-OUT ASSAY)

Un transposon de pe un plasmid neconjugativ nu va fi transferat în alte celule dacă nu se translocă pe un plasmid transferabil (Fig. 20).

Transpozonul Tn*10*, care poartă o genă de rezistență la tetraciclină, este inserat într-un plasmid mic, neconjugativ și nemobilizabil, folosit pentru a transforma celule care conțin un plasmid F. În timpul creșterii celulare, transpozonul poate sări din plasmidul mic în plasmidul F, în câteva celule. Ulterior, când aceste celule sunt amestecate cu celule receptoare rezistente

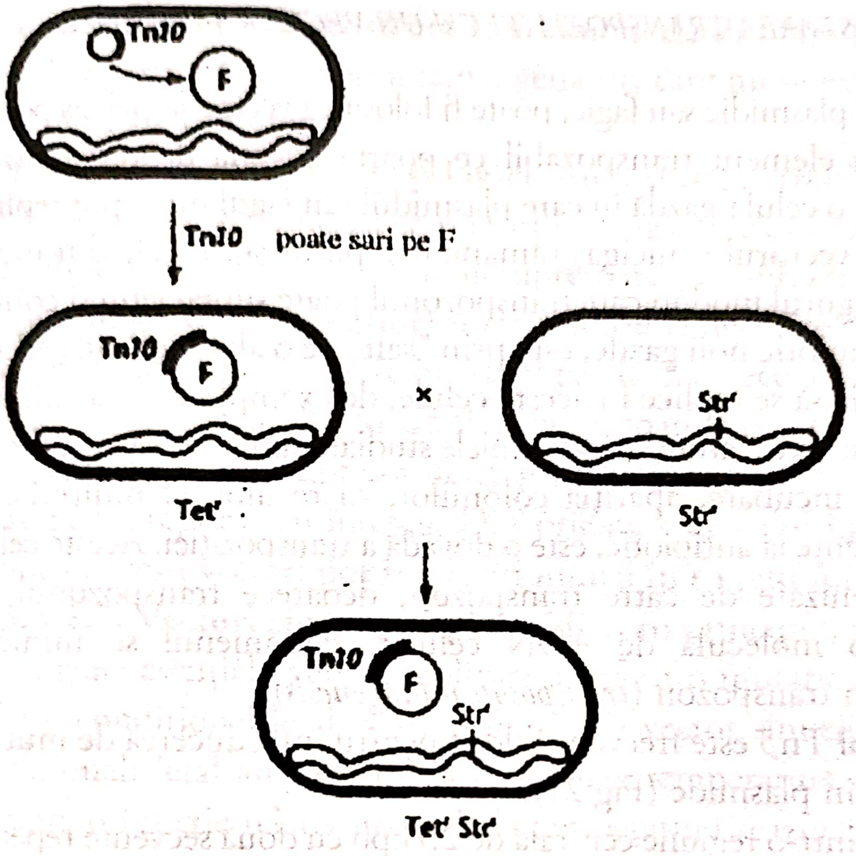


Fig. 20— Exemplu de test bazat pe conjugare (***mating-out assay***) pentru transpoziție (după Snyder și Champness, 1997)

la streptomicină, orice plasmid F care poartă transpozonul și care se transferă prin conjugare, va conferi transconjuganților rezistență la tetraciclină. Transpoziția poate fi detectată prin cultivarea amestecului de conjugare pe mediu cu tetraciclină și contraselectând donorul cu streptomicină.

Apariția transconjuganților rezistenți la antibiotic într-un astfel de test, nu este o dovadă absolută a transpoziției. Unii transconjuganți ar putea deveni rezistenți la antibiotice pe alte căi decât transpoziția transpozonului în plasmidul conjugativ. Plasmidul mic care conține transpozonul ar fi putut fi mobilizat în vreun fel de plasmidul mare, sau plasmidul mic ar fi putut fi lipit (*fused*) de plasmidul mare prin recombinare sau prin formare de cointegrate. Câțiva transconjuganți reprezentativi trebuie testați, de exemplu, folosind enzime de restricție pentru a verifica prezența exclusiv a plasmidului mare cu transpozonul inserat.

3.3.2. TESTAREA TRANSPOZIȚIEI CU UN VECTOR SINUCIGAȘ

Orice ADN, plasmidic sau fagic, poate fi folosit ca vector sinucigaș pentru a introduce un element transpozabil ce poartă o genă de rezistență la antibiotice, într-o celulă-gazdă în care plasmidul sau fagul nu se pot replica. În noua gazdă, vectorul sinucigaș rămâne nereplicat și, în cele din urmă, se va pierde. Singurul mod în care transpozonul poate supraviețui și conferi rezistență la antibiotic noii gazde, este prin "salt" pe o altă moleculă ADN, care este capabilă să se replice în aceste celule, de exemplu un plasmid sau cromozomul. De aceea, atunci când celulele studiate sunt cultivate pe mediu cu antibiotic și incubate, apariția coloniilor, ca rezultat al multiplicării bacteriilor rezistente la antibiotic, este o dovadă a transpoziției. Aceste celule au fost mutagenizate de către transpozon, deoarece transpozonul s-a translocat pe o moleculă de ADN celular. Fenomenul se numește mutageneză prin transpozon (*transposon mutagenesis*).

Transpozonul Tn*5* este frecvent folosit pentru introducerea de mutații în ADN clonat în plasmide (Fig.21).

Tn*5* constă dintr-o regiune centrală de 2,7kpb cu două secvențe repetate invers (IS*50*) la fiecare capăt, fiecare secvență de inserție având 1,5kpb. Cele două secvențe de inserție, IS*50*L (stânga) și IS*50*R (dreapta) diferă printr-un singur nucleotid în poziția 1442. IS*50*R codifică pentru două proteine traduse dintr-un singur cadru de citire, o transpozază și un inhibitor de transpoziție. Modificarea unei singure baze introduce o mutație *ochre* (codon ochre: codonul nonsens UAA) în acest cadru de citire din IS*50*L, producând proteine trunchiate. Aceeași modificare de o bază creează un promotor în IS*50*L pentru trei gene de rezistență la antibiotice, din regiunea centrală: gena *kan*, care codifică pentru o aminoglicozid fosfotransferază care inactivează kanamicina și neomicina în bacterii și G418 în celulele eucariote;

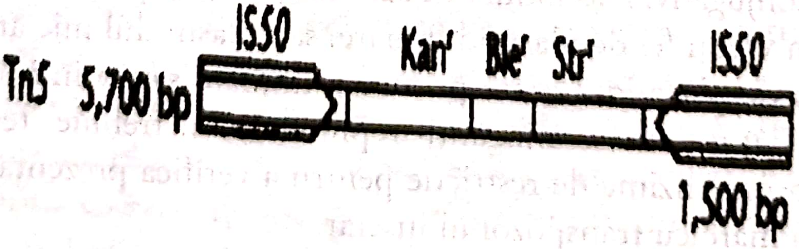


Fig. 21 — Structura transpozonului compus Tn5. (după Snyder și Champness, 1997)

gena *ble*, care conferă rezistență la antibioticele din familia bleomicinei; gena de rezistență la streptomicina, gena *str*, care nu se exprimă în *E.coli*, decât daca are o mutație.

3.3.2.1. Vectori sinucigași fagici. Au fost inginerizați unii derivati ai fagului λ pentru a fi folosiți ca vectori sinucigași. Acesti fagi au fost făcuți incapabili de replicare în gazde nesupresoare prin prezența unor codoni nonsens în genele *O* (operator) și *P* (promotor) necesare pentru replicare. Ei nu pot nici să se integreze în ADN gazdă deoarece a avut loc și deleția regiunii de atașare, *attP*. Un astfel de fag λ poate fi propagat într-o tulpină *E.coli* care poartă un supresor nonsens. Într-o tulpină *E.coli* nonsupresor, nu se poate replica sau integra. Din pricina spectrului îngust de gazdă a fagilor λ, acești vectori pot fi folosiți numai în tulpini *E.coli* K-12.

3.3.2.2. Vectori sinucigași plasmidici. În principiu, orice plasmid în care o genă esențială pentru replicare a suferit o mutație ce generează un fenotip condițional letal poate fi folosit ca vector sinucigaș. Ca mutanți condiționali letal au fost utilizați mult cei temperatură – sensibili, care prezintă o funcție relativ normală la temperatura scazută, dar inactivează produsul respectiv la temperatură ridicată, cât și cei cu mutații nonsens, supresibile în gazde adecvate. Plasmidul poate fi propagat într-o gazdă permisivă sau în condiții permisive și apoi introdus într-o gazdă nepermisivă sau în aceeași gazdă în condiții nepermisive, funcție de tipul de mutație. Alternativ, se poate folosi un plasmid cu spectru îngust de gazdă. Acesta poate fi propagat într-o gazdă în care se poate replica și apoi introdus într-o specie diferită în care nu se poate replica. Vectorii sinucigași plasmidici pot fi introduși în celule prin transformare. Totuși, conjugarea este mai eficientă. Dacă plasmidul are o regiune *mob*, poate fi mobilizat în celula receptoare folosind funcțiile Tra ale unui plasmid conjugativ.

3.4. TRANSPOZONI CONJUGATIVI

Reprezintă elemente genetice mobile, de tip ADN, integrate într-un genom bacterian și caracterizate prin capacitatea lor de a trece dintr-o celulă bacteriană în alta printr-un proces care necesită contactul dintre cele două celule și, implicit, printr-un mecanism înrudit cu conjugarea descrisă la

E.coli. Aceste elemente sunt capabile atât de transpoziție intracelulară, cât și de transfer intercelular.

Transpozonii conjugativi au fost descoperiți la sfârșitul anilor '70 în bacterii gram-pozitive, unde sunt structuri relativ comune. Sunt mai rar întâlniți în bacterii gram-negative, dar au fost descriși și sunt bine studiați cei din genul *Bacteroides*. Deoarece transpozonii conjugativi sunt elemente integrate, exceptând etapa transferului prin conjugare, nu există nici o modalitate sistematică, analog cu procedeele de izolare a plasmidelor, de a-i depista, prezența lor fiind sugerată indirect. O astfel de indicație poate fi reprezentată de transferul prin conjugare al unor gene cromozomale, în absența plasmidelor sau autotransferul aparent al unor plasmide prea mici, pentru a putea fi conjugative. S-a demonstrat că transpozonii conjugativi pot mobiliza plasmide corezidente, în *trans*.

Asemenea transpozonilor clasici, transpozonii conjugativi, sunt excizați din și integrați în ADN, însă mecanismul de transpoziție este diferit. Transpoziția începe prin excizia transpozonului și formarea unui intermediar ADN, circular covalent închis, nereplicativ. Intermediarul nereplicativ se poate reinsera într-un genom țintă (cromozom sau plasmid), se poate autotransfera într-o alta celulă sau se poate pierde în cursul diviziunii celulare, din cauza instabilității segregaționale. În etapa de excizie, la capătul elementului (în cazul transpozonului Tn*916*) apar monocatene de câte șase nucleotide, ca urmare a unor incizii decalate, numite **secvențe de cuplare**. Secvențele de cuplare monocatenare heterologe se leagă covalent pentru a forma intermediarul circular. Inserția acestui intermediar în noul situs de integrare poate fi considerată ca reacția inversă excizării. Transpozonii conjugativi se integrează relativ întâmplător în majoritatea gazdelor (Tn*916* are o evidentă predilecție pentru secvențe formate din A și T) și nu produc duplicarea situsului de integrare. Mecanismul prin care intermediarul circular al transpozonului se transferă într-o altă bacterie rămâne încă neclar. Rezultate recente par să indice că intermediarul este transferat în bacteria receptoare sub formă de ADN monocatenar.

Transpozonul conjugativ Tn*916* din *E.faecalis* DS16 codifică pentru rezistența la tetracicline (gena *tetM*) și conține determinanții necesari pentru mobilitatea proprie. Secvența sa completă, publicată, indică un element de 18032pb, cu un conținut total G+C de 38,8%. Structura sa internă este definită de digestia cu *Hin*cII: Tn*916* prezintă cinci fragmente interne

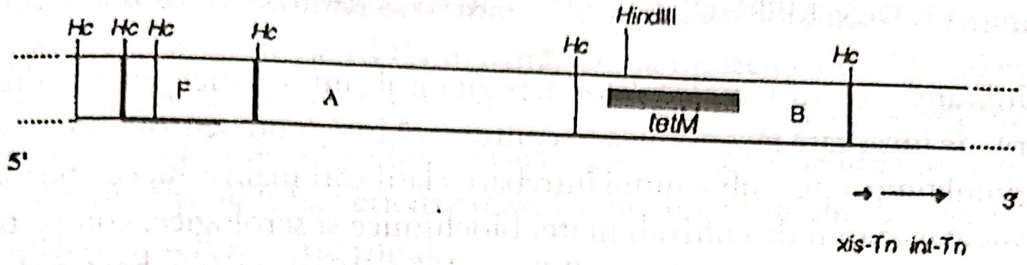


Fig. 22 — Harta fizică a transpozonului Tn 916

*Hinc*II (5624, 4911, 1775, 1211, 462pb). Fragmentul de 4,9kpb poartă gena *tet M*. Tn*916* are un singur situs de restricție *Hind*III. Profilul de digestie *Hind*III dă informații privind situsul de inserție și numărul de cópii Tn*916* în cromozomul tulpinii studiate. Tn*916* nu are situs *Eco*RI. Analiza secvenței complete a identificat 24 potențiale faze deschise de citire. La extremități se află secvențe invers repetate imperfecte, 20/26pb (Fig. 22).

Localizarea lui Tn*916* este preferențial cromozomală. Frecvențele de transfer prin conjugare de la un cromozom la altul variază între 10^{-5} și 10^{-9}, funcție de bacteria donoare. Spre deosebire de transpozonii de tip Tn*3*, Tn*916* nu conferă imunitate de transpoziție, deoarece în transconjuganți, Tn*916* se întâlnește frecvent în mai multe cópii, integrate în locuri diferite.

4. UTILIZAREA TEHNICILOR DE ANALIZĂ MOLECULARĂ A GENOMULUI BACTERIAN ÎN DIAGNOSTIC ȘI EPIDEMIOLOGIE

Analiza *acizilor nucleici* are ca scop descifrarea informației genetice utilizabilă în studii taxonomice și/sau epidemiologice precum și în instituirea unor strategii de prevenire și control al infecțiilor bacteriene.

Avantajele oferite de studiul acizilor nucleici (ușurința cu care sunt extrași și purificați, strategii comune de abordare a studiului indiferent de sursa de izolare a acestora, rapiditatea și specificitatea diagnosticului în cazul infecțiilor produse de germeni greu cultivabili sau noncultivabili, etc.) impun metodele moleculare de analiză, ca metode uzuale în laboratoarele de diagnostic și epidemiologie.

Producerea unor evenimente genetice în regiuni înalt conservate conduce la variabilitatea tulpinilor în cadrul speciei, evidențierea lor constituind markeri genetici utili în subtipizarea tulpinilor.

4.1. DESCRIERE DE GENOTIPURI ÎN SCOP TAXONOMIC

Utilizarea structurii moleculelor depozitare ale informației genetice drept criteriu de încadrare taxonomica se conturează într-o preocupare nouă care în ultimul timp a pus sub semnul întrebării clasificări mai vechi, ce utilizează în principal criterii de cultivabilitate, biochimice și serologice, completate în unele cazuri, la bacterii, de sensibilitate la antibiotice și/sau bacteriofagi, precum și producerea și/sau sensibilitatea la bacteriocine.

În acest scop, sunt utilizate în special regiuni genomice puțin afectate de presiuni selective, care pot fi descrise ca *„ceasuri moleculare"*. Utilizarea criteriilor moleculare de clasificare este completată de furnizarea de instrumente moleculare de identificare și încadrare taxonomică rapidă.

4.2. ANALIZA MOLECULARĂ A ADN TOTAL ÎN SCOP EPIDEMIOLOGIC

4.2.1. ANALIZA DE RESTRICȚIE A GENOMULUI BACTERIAN

Analiza de restricție a genomului bacterian (***RFLP** = **restriction fragment length polymorphism***) oferă informații utile privind structura genetică a microorganismelor în studiu. ADN total, purificat, este supus digestiei cu endonucleaze de restricție. În funcție de compoziția în baze azotate și de secvența acestora, o moleculă de ADN va fi scindată într-un număr determinat de fragmente, cu greutăți moleculare diferite. Două molecule, cu structură genetică identică, vor prezenta totdeauna, după digestie cu aceeași enzimă, un profil de restricție identic, atât ca număr de fragmente cât și ca greutate moleculară.

La *Mycobacterium,* RFLP pentru PGRS este utilizat pentru compararea tulpinilor și evidențierea diferențelor dintre acestea. În acest scop, fragmentele rezultate după digestia ADN total cu o enzimă de elecție, sunt supuse reacției de hibridizare cu o sondă reprezentată de un oligonucleotid cu secvență identică cu cea a PGRS. Profilele de hibridizare vor stabili identitatea/diversitatea tulpinilor analizate. Metoda a fost utilizată pentru caracterizarea tulpinilor de *M.bovis* BCG utilizate în România pentru producerea vaccinului BCG.

Reacția de amplificare enzimatică în lanț (PCR),utilizând primeri universali, alcătuiți din aproximativ 10 baze (*RAPD, AP-PCR*), conduce la amplificarea unui număr determinat de fragmente, în funcție de numărul de omologii întâlnite pe ADN matriță. Două molecule de ADN identice, folosite ca matriță în reacția de amplificare cu același primer, vor genera un profil de amplificare identic. Reacția este deosebit de utilă în stabilirea clonalității tulpinilor bacteriene aparținătoare unei epidemii sau unui focar de infecție interioară, de spital.

4.2.2. VARIABILITATEA TULPINILOR BACTERIENE LA NIVEL DE SPECIE.

Variabilitatea tulpinilor în cadrul aceleiași specii constituie suportul care stă la baza elaborării metodelor de studiu epidemiologic, în vederea stabilirii filiațiunii cazurilor. Diferențierea tulpinilor bacteriene aparținând aceleiași specii, izolate dintr-un anume context epidemiologic, se realizează în practica de laborator prin analiza de restricție și/sau hibridizare cu probe (sonde) specifice.

Numărul operonilor *rrn*, precum și poziția diferitelor gene în structura acestora reprezintă suportul teoretic al **ribotipiei** ca metodă de analiză epidemiologică

Din punct de vedre tehnic, calea cea mai simplă de a explora polimorfismul operonilor *rrn* constă în analiza de restricție a genelor care codifică sinteza ARN ribozomal. Fragmentele generate sub acțiunea enzimelor de restricție sunt separate în gel de agaroză și sunt transferate pe un suport solid unde sunt hibridizate cu sonde specifice. Sondele nucleotidice utilizate pentru evidențierea operonilor *rrn* sunt numeroase. Operonul complet *rrn*B (*rrs* si *rrl*) a fost clonat, ca o parte a unui insert de 7.5kpb, în plasmidul pKK3535. Plasmidul recombinat pKK3535, în întregime sau fragmente din acesta, marcate cu γ-^{32}P-ATP, biotina, sau digoxigenina, au constituit pe rând sonde pentru detectarea genelor *rrn*. Un fragment *Bcl* I de 5.4kpb al plasmidului pKK3535, modificat prin atașarea unui linker *Pst* I a fost subclonat în pUC19 și utilizat ca sondă în analizele de restricție pentru genele care codifică pentru ARNr.

Plasmidul recombinant pBA2, conținând un insert de 2.3kpb, marcat cu γ-^{32}P-ATP, a fost utilizat ca probă în ribotipizarea bacteriilor Gram-pozitive.

Sondele clonate, utilizate pentru ribotipie, s-au diferențiat între ele prin lungime și secvență, acoperind segmente ale genelor *rrs* și/sau *rrl*, incluzând sau nu spații intergenice. În 1997 a fost propusă o nouă metodă pentru ribotipie, aplicabilă tuturor grupelor taxonomice, în care sondele sunt reprezentate de cinci oligonucleotide, două complementare cu regiuni conservate pentru secvența *rrs* și trei pentru secvența *rrl*.

Ribotipia a fost utilizată ca metodă moleculară pentru evaluarea unui focar produs cu *Enterobacter cloacae*, la care se suspecta originea nosocomială, precum și pentru a identifica sursa de infecție într-o izbucnire neonatală cu *E.sakazaki*. La *Legionella*, după analiza a 28 specii, s-a demonstrat că ribotipul este specific de specie.

Ribotipia reprezintă un sistem de tipaj sensibil, superior metodelor clasice de studiu epidemiologic, reușind să diferențieze tulpinile de *S.typhi* aparținătoare aceluiași tip fagic, rezistente la acțiunea litică a fagilor sau cu un spectru atipic de sensibilitate. A fost utilizată ca sistem complementar de identificare a sursei de infecție în focarele produse de *S. senftenberg* și *S.typhimurium* în complexe de creștere a animalelor.

Pseudomonas aeruginosa, P.cepacia, M.catarrhalis, specii de *Rhodococcus, Enterococcus,* etc. au fost tipizate prin restricție enzimatică și hibridizare specifică pentru detectarea genelor responsabile de sinteza ARN ribozomal.

Utilizând ca sondă nucleotidică ARN 16S+23S de la *E.coli,* marcată chemiluminiscent, tulpini de *V.cholerae* O1 izolate în diferite regiuni ale lumii, au fost subtipizate în 17 patternuri de restricție pentru genele care codifică sinteza ARNr, după scindarea genomului total cu *Bgl*I. S-a demonstrat că tulpinile, biotip *cholerae* și *ElTor,* izolate în a șaptea pandemie de holeră, aparțin unor clone diferite și că pandemia nu este o epidemie mondială, ci o sumă de epidemii simultane, produse de clone diferite, iar valurile noi epidemice cu biotip *ElTor* se datoresc emergenței unor noi clone.

Ribotipia a fost utilizată pentru diferențierea tulpinilor de *V.cholerae* O1 izolate în România, între anii 1977 și 1995, precum și cele izolate în Republica Moldova, în anii 1994 și 1995, în vederea stabilirii circulației tulpinilor, încadrării lor în cea de-a șaptea pandemie de holeră precum și detectării unui transfer de tulpini de la o regiune geografică la alta. Ribotipul este reproductibil și stabil. În scopul uniformizării metodei de analiză, în anul 1993, s-a propus o schemă de standardizare a ribotipiei pe baza unui număr important de tulpini de *V.cholerae* O1, izolate din cazuri de boală și din mediu.

Reemergența difteriei după 1990 în fostele state sovietice a condus la o concentrare importantă a interesului organismelor internaționale de supraveghere și control al bolilor infecțioase în vederea limitării extinderii și eliminării îmbolnăvirilor. Studiile de epidemiologie moleculară bazate pe analiza de restricție a genelor ARNr au condus la identificarea clonelor epidemice și la trasarea evoluției teritoriale a epidemiei. Tulpinile circulante în Romania în această perioadă au fost deasemenea analizate, concluzionandu-se că nu a avut loc import de tulpini epidemice in timpul ultimei epidemii de difterie.

PCR-ribotipia constă în analiza prin enzime de restricție a spațiului intergenic 16S - 23S din operonul *rrn*, după amplificare enzimatică în lanț (PCR). Metoda detectează diferențe privind secvența spațiului intergenic la tulpini aparținând aceleiași specii.

PCR-SSCP (*single strand conformation polymorfism*) este o metodă moleculară utilizată în studiile de taxonomie și constă în amplificarea ARNr cu ajutorul unor primeri desemnați pe baza omologiei cu regiuni înalt conservate de pe secvența 16S. Produșii de amplificare, reprezentați de ADN dublu catenar, sunt denaturați și apoi separați în gel de poliacrilamidă. În condiții nedenaturante de electroforeză, mobilitatea lanțurilor monocatenare de ADN este dependentă de secvența nucleotidică, secvență care induce conformația moleculei. Benzi de ADN monocatenar, care migreaza la distante diferite in gelul de poliacrilamidă, indică secvențe diferite ale moleculei.

4.2.3. DETERMINAREA STRUCTURII CLONALE A POPULAȚIILOR BACTERIENE

Determinarea clonalitații tulpinilor aparținând unui taxon cu importanță în patologia umană sau animală, larg răspândit într-o regiune geografică, se realizează, în practica laboratoarelor de biologie moleculară, prin studierea profilului de restricție enzimatică a ADN total, după ***electroforeză în câmp pulsator*** (PFGE).

Electroforeza în câmp pulsator presupune includerea microorganismului de studiat în agaroză, liza celulelor microbiene *in situ* și digestia ADN total cu enzime cu situsuri rare de recunoaștere pe cromozom. Fragmentele generate în urma digestiei sunt separate într-un pattern de benzi discrete, în funcție de greutatea lor moleculară, prin electroforeză în gel de agaroză, sub acțiunea unui curent electric care-și schimbă sensul după un program prestabilit. Patternurile de restricție sunt markeri moleculari utili în stabilirea gradului de înrudire și a clonalității tulpinilor studiate.

Tulpinile sunt considerate *clonale,* atunci când patternurile lor de restricție prezintă același număr de fragmente, fragmentele corespondente având aceeași greutate moleculară.

Tulpinile sunt considerate *strâns înrudite,* atunci când profilurile de digestie diferă prin două sau trei fragmente.

Profilul de macrorestricție în câmp pulsator a fost utilizat ca instrument epidemiologic în studierea tulpinilor de *P.aeruginosa*, *E.faecium,* precum și în evaluarea infecțiilor nozocomiale produse de *S.aureus, Legionella pneunmophilia,* sau *E.cloacae,* într-o unitate de nou-născuți. Acesta diferențiază net tulpinile de *E.coli* O157:H7 de tulpinile netoxigene de *E.coli* O157:H19, O157:H43, O157:H45 și de tulpinile de *E.coli* aparținând altor serogrupuri producătoare de toxină *shiga-like*.

În scopul investigării prezenței unor focare de holeră și a posibilității răspândirii acesteia în Europa, prin intermediul călătoriilor și/sau al alimentelor contaminate care vin din zonele endemice, s-a utilizat profilul de macrorestricție, asociat ribotipului, pentru studierea tulpinilor izolate de la bolnavi, din alimente și din rezervoarele naturale din Spania, în anii 1990 - 1992.

Epidemia de holeră determinată de *V.cholerae* O139 a fost investigată cu ajutorul profilului de restricție în câmp pulsator, pentru a stabili înrudirea genetică a tulpinilor aparținând acestui serotip cu serotipul O1. Toate tulpinile implicate în epidemie au prezentat un pattern de restricție identic, dar diferit de tulpinile O1. S-a presupus atunci că acestea aparțin unei noi clone care ar putea genera a opta pandemie de holeră.

Metoda a fost utilizată pentru stabilirea clonalității tulpinilor de *S.pneumoniae* izolate în România, precum și a înrudirii epidemiologice a tulpinilor de *S.pyogenes* izolate în Albania în timpul epidemiei de scarlatină din anii 1980-1982, cu cele circulante în general, în această regiune geografică.

Genele responsabile de sinteza toxinei holerice (*ctx*) la *V.cholerae* sunt organizate într-o singură unitate transcripțională, cistronul A, fiind localizat înaintea cistronului B.

Operonul *ctx* împreună cu genele *zot*, responsabile de producerea toxinei *zonula occludens* (ZOT) și *ace* care specifică toxina holerică accesorie (ACE), sunt localizate pe cromozomul bacterian într-o regiune de 4.5kpb, numită "*core region*".

Gena *zot* se află în imediata vecinătate a operonului *ctx* și constă dintr-un cadru de citire de 1.3kpb care, potențial, codifică un polipeptid de 44.8kDa.

Gena *ace* este localizată în nemijlocita vecinătate a genei *zot* și poate codifica un peptid de 96 amino acizi, cu o greutate moleculară de 11.3kDa.

Regiunea este flancată de una sau mai multe cópii ale unei secvențe RS1, de 2.7kpb. Recombinarea între regiunile RS1 poate duce la duplicarea sau multiplicarea în tandem a regiunii "*core*", precum și la deleții, la acest nivel.

Un studiu privind distribuția genelor care alcătuiesc caseta de virulență la *V.cholerae* a arătat că majoritatea tulpinilor O1 conțin o casetă completă, deși s-au identificat tulpini cu deleții în *ctx*, *ace* sau zo*t*.

Pentru detectarea unor evenimente genetice care s-au putut produce la nivelul casetei de virulență, la tulpinile izolate în România, a fost utilizată ca metodă moleculară de analiză ***toxigenotipia.*** Plasmidul *pJM17*, obținut din pBR322, prin inserția unui fragment de 1.8kpb, care conține determinanții genetici pentru sinteza subunităților A și B ale toxinei holerice, linearizat prin digestie cu *Pst*I, a fost utilizat ca sondă pentru hibridizarea fragmentelor generate în urma digestiei ADN total cu *Bgl*I. S-a constatat existența unui număr important de tulpini cu casetă de virulență incompletă printre tulpinile luate în studiu.

4.3. DIAGNOSTICUL MOLECULAR AL INFECȚIILOR BACTERIENE

În anumite circumstanțe, identificarea unor proprietăți fenotipice se poate face mai rapid și/sau mai economic, prin analiza regiunilor genomice ce înmagazinează informația corespunzătoare. Acest tip de analiză, țintită, necesită informații precise despre organizarea genomului agentului patogen sau evidențiază în secvența nucleotidică a unui genom necunoscut o structură de interes medical. Ținta unei astfel de analize este cuprinsă, în funcție de patogen, între o genă sau un fragment de genă.

Secvența de inserție IS*6110*, element genetic de 1360pb, prezintă un interes particular datorită potențialului său ridicat în diagnostic și epidemiologie. Acesta este întâlnit în una sau mai multe cópii, la tulpini de *Mycobacterium* aparținând complexului *tuberculosis.* Prin urmare, identificarea sa prin reacția de PCR, executată pe produsul patologic, indică suspiciune de tuberculoză și orientează tratamentul cu două-trei săptamâni mai repede, dacă luăm în calcul timpul necesar pentru cultivarea micobacteriilor în laborator, sau, în alte cazuri, lipsa unei confirmări bacteriologice.

Detectarea tulpinilor capabile de a produce toxina difterică, atunci când cantitatea elaborată de acestea este sub nivelul detectabil prin reacția de imunodifuzie în gel, este un alt exemplu de diagnostic prin PCR, a agenților infecțioși.

Tulpinile patogene de *E.coli* nu pot fi diferențiate prin metode clasice de tipizare. Patogenitatea acestora este specificată de gene care, în cele mai multe cazuri, sunt localizate pe plasmide sau sunt purtate de fagi lizogeni. Aceste tulpini sunt identificate fie prin evidențierea factorilor de virulență pe linii celulare, pe animale de laborator sau prin teste imunoenzimatice, fie prin identificarea structurilor genetice responsabile de patogenitate, prin reacție de amplificare de tip PCR sau hibridizare pe colonii.

4.4. PROFILUL PLASMIDIC, PLASMIDE EPIDEMICE ȘI/SAU PLASMIDE CU REZISTENȚĂ LA MULTIPLE ANTIBIOTICE

Capacitatea plasmidelor conjugative de a se transfera de la o celulă la alta, în cadrul aceluiași grup taxonomic și/sau în afara acestuia, când gradul de înrudire este apropiat, crește importanța profilului plasmidic în studiile epidemiologice. Detectarea unui profil plasmidic identic, confirmat prin profil de restricție enzimatică identic, indică apartenența tulpinilor studiate la un focar comun. În mediul spitalicesc, sub presiunea selectivă a antibioticelor, evoluează populații bacteriene care poartă plasmide de rezistență multiplă la antibiotice și care, chiar dacă în mod natural sunt comensale, ele pot deveni agresive atunci când afectează pacienți imunocompromiși. Detectarea aceluiași plasmid la un număr important de tulpini, apartinând aceleiași specii sau la specii înrudite, conduce la suspiciune de infecție interioară de spital, conceptul vehiculat în aceste cazuri fiind cel de *plasmid epidemic*.

Metodele moleculare de analiză au un rol deosebit de important în cunoașterea structurii genetice a microorganismelor circulante într-o zonă geografică și într-un anume timp, informațiile fiind utile în studiul circulației agenților infecțioși, în stabilirea originii unor epidemii, a căii parcurse și modului de diseminare a acesteia, precum și detectarea importului într-o zonă indemnă.

Tehnicile de biologie moleculară se recomandă prin specificitate, selectivitate și rapiditate ca metode de analiză epidemiologică cel puțin la nivelul Centrelor Naționale de Referință. Datorită dezvoltării sondelor reci, inconvenientul lucrului cu material radioactiv a fost eliminat, reacțiile de hibridizare și secvențiere putându-se efectua la nivelul oricărui laborator dotat cu bază tehnică corespunzătoare.

Analiza asistată de ordinator a imaginii și tratarea statistică a datelor a crescut exactitatea și ușurința comparării moleculelor de ADN de diferite origini.

Extracția și secvențierea automată a acizilor nucleici au redus considerabil consumul de reactivi și timp de execuție, iar aparatele pentru PCR au revoluționat diagnosticul infecțiilor microbiene, reacțiile putându-se efectua direct pe produsul patologic.

Utilizarea tehnicilor de biologie moleculară asociate metodelor clasice de tipizare, conduce la un studiu epidemiologic complet și eficient.

CAPITOLUL XI

GENOMUL CIANOBACTERIAN

1. GENERALITĂȚI

În termeni de longevitate și de influență asupra mediului, cianobacteriile (algele albastre-verzi) sunt printre cele mai de succes și de mare semnificație ecologică între miliardele de specii de viețuitoare care au apărut în evoluția vieții pe Terra, având perioade de dominanță asupra tuturor celorlalte sisteme biologice. In lipsa unor organite specializate pentru realizarea unor funcții specifice, celula cianobacteriilor, asemănător celei bacteriene, funcționează ca un SINERGON, îndeplinind ca un tot unitar, fără compartimentalizare, toate funcțiile metabolice care întrețin viața: fotosinteză, respirație, creștere, reproducere. Mai puțin diversificate fiziologic și biochimic decât bacteriile, cianobacteriile au o mult mai mare diversificare morfologică, față de acestea.

Cianobacteriile sunt bacterii gram-negative fotosintetizante, identificate în recorduri paleontologice de miliarde de ani, cele mai cunoscute fiind depozitele de stromatolite, datând de acum aproximativ 2–1,8 miliarde de ani când, printr-o dezvoltare abundentă, au degajat cantități uriașe de oxigen în apă și atmosferă, generând astfel cea de a doua criză ecologică de nivel planetar – criza oxigenului. Acesta a constituit momentul de răscruce datorită căruia unele organisme care au supraviețuit au adoptat strategia endosimbiozelor succesive, strategie care a culminat cu geneza celulei eucariote – cel mai mare salt evolutiv din lumea vie. Se cunosc până în prezent aproximativ 2000 de specii de cianobacterii.

Încă din anul 1875, Ferdinand Cohn, pe baza caracterelor comune, asociază algele albastre-verzi cu bacteriile și le încadrează în unitatea taxonomică *Schizophyta*. În anul 1960, R.Y. Stanier a evidențiat structura tipic procariotă a cianoficeelor, numindu-le cianobacterii.

Interesante din punct de vedere fundamental, constituind obiecte de studiu ideale pentru descifrarea mecanismelor moleculare ale fotosintezei, pentru organizarea genomului procariot și analiza moleculară a aparatului de fixare a azotului molecular, cianobacteriile prezintă și interes practic legat de eutrofizarea bazinelor acvatice, de producerea de toxine cianobacteriene, de utilizarea lor ca sursă de azot, în agricultură, precum și ca resursă nutritivă și de vitamine pentru animale și om.

Genul *Prochloron*, acceptat printre cianobacterii, dar care este mai curând bacterie fotosintetizatoare, având multe însușiri comune cu eubacteriile fotosintetizante, este considerat candidatul cel mai sigur pentru ancestorii cloroplastelor actuale.

Cianobacteriile au o plasticitate ecologică impresionantă, fiind întâlnite în izvoare termale, sub gheață, în regiunile polare, în dunele de nisip ale deșerturilor, în lacuri sărate, la concentrații saline mari (hipersalinitate), pe stâncile munților, pe sol și în sol, în ape dulci curgătoare sau stătătoare, în mări și oceane, etc. Unele specii de cianobacterii unicelulare sau filamentoase, cu heterociști sau lipsite de asemenea celule specializate, diferențiate, sunt fixatoare de azot molecular. Alte specii de cianobacterii sunt producătoare de hidrogen molecular și sunt considerate ca surse neconvenționale de energie nepoluantă. Multe specii de cianobacterii constituie obiective biotehnologice ca surse de proteine produse de organisme unicelulare sau sunt capabile de a metaboliza agenți poluanți, devenind astfel sanitarii mediilor poluate.

Cianobacteriile sunt procariote tipice, deoarece sunt lipsite de organite precum mitocondriile și cloroplastele, fiind lipsite și de un spațiu genetic delimitat de o membrană, astfel că, asemănător bacteriilor, materialul lor genetic ia contact direct cu procesele fundamentale ale citoplasmei. Materialul genetic al cianobacteriilor este reprezentat de fibrile de ADN dispuse la nivelul nucleoidului, acesta fiind situat, de regulă, în centrul celulei. Cianobacteriile nu conțin clorofila b, dar conțin clorofila a și ficobilină, desfășurând o fotosinteză oxigenică de tipul celei de la plantele superioare.

Spre deosebire de bacterii, care prezintă o mare diversitate fiziologică și biochimică, cianobacteriile prezintă o mare diversitate morfologică, ca o consecință a unei redundanțe informaționale mai mari, precum și a implicării unor mecanisme de reglaj genetic mai sofisticate, mai nuanțate, în cadrul cărora sunt scoase din funcțiune sau introduse în funcțiune seturi de gene în raport de condițiile specifice de biotop sau de mediu de cultură. Cianobacteriile prezintă o mare adaptabilitate la habitate cu mari variații în pH, în concentrația de oxigen și în luminozitate, ceea ce vădește vechimea lor remarcabilă.

Cercetările din ultimele două decenii dovedesc că cianobacteriile pot constitui un excelent obiect de studiu privind diferențierea celulară, morfogeneza, în speță morfogeneza septului de diviziune și a celulelor specializate precum akineți, necrocite sau nanocite, heterociști, etc.

Datorită marilor dificultăți întâmpinate în stabilirea statutului taxonomic al cianobacteriilor, în special în acordarea acestuia la rigorile Codului Botanic, Stanier și colab. (1978) au propus tratarea cianobacteriilor după regulile Codului bacteriologic, constituind diviziunea I Cyanobacteria a regnului Prokaryota și cuprinzând cinci secțiuni.

Cianobacteriile unicelulare, sferice, ovale au cea mai simplă arhitectură structurală, reproducându-se prin diviziune simplă (sciziparitate, precum bacteriile, prin formarea unui septum de diviziune care separă celula-mamă în două celule-fiice, după modelul de închidere a unei diafragme) sau prin înmugurire. In secțiunea II sunt cuprinse cianobacteriile care se reproduc prin diviziune multiplă, producându-se celule mici care au fost numite **beocite** sau prin diviziune simplă. Celulele izolate pot forma agregate coloniale menținute de straturi externe adiționale ale peretelui celular.

In secțiunea III sunt cuprinse cianobacterii filamentoase care sunt alcătuite din **trichom**, acesta reprezentând un lanț neramificat de celule uniseriate și care crește prin diviziunea, doar într-un singur plan, a celulelor sale. Reproducerea este realizată prin ruperea randomică a trichomului sau prin germinarea unor celule cu morfologie particulară, de regulă cu dimensiune mai mare decât a celorlalte celule și care s-au numit **akineți.**

Următoarele două secțiuni III și IV cuprind tot cianobacterii filamentoase, cu trichom care crește prin diviziune celulară dar, în acest caz se formează hormogonii. Acestea reprezintă un lanț scurt de celule care se deosebesc de trichomul vegetativ din care provin prin mobilitate sau diferențe de mărime sau structură ale celulelor componente. La aceste cianobacterii se pot diferenția și akineți și heterociști (în absența azotului combinat).

Unii reprezentanți ai cianobacteriilor din secțiunea I care se reproduc prin diviziune simplă sunt lipsiți de tilacoide, prezentând teacă galerctică, așa cum este cazul lui *Gloeobacter* sp. sau prezintă tilacoide și teacă de gelatină, așa cum este cazul lui *Gloeothece* sp și *Gloeocapsa* sp.

Genurile de cianobacterii unicelulare *Synechococcus* și *Synechocystis* prezintă tilacoide, dar sunt lipsite de teaca galerctică.

Tot în secțiunea I este încadrat și genul *Chamaesiphon* care prezintă tilacoide, dar se reproduce prin înmugurire.

In secțiunea II sunt cuprinse cianobacterii care prezintă doar diviziune multiplă, cu producere de beocite mobile (ex. *Dermocarpa*) sau imobile (ex. *Xenococcus*). In această secțiune sunt cuprinse și cianobacterii cu reproducere prin diviziune simplă sau prin diviziune multiplă. La *Dermocarpella*, diviziunea simplă conduce la realizarea unei formații în formă de pară, în care apar una sau două celule bazale și o celulă apicală care, ulterior, se divide multiplu, producând beocite mobile. La *Myxosarcina* și *Chroococcidiopsis*, prin diviziune simplă, se produc mai întâi agregate cubice, iar ulterior, prin diviziune multiplă, se produc beocite mobile, respectiv imobile. La *Pleurocapsa*, prin diviziune simplă, se produc agregate celulare neregulate (pseudofilamente), pentru ca ulterior, prin diviziune multiplă, să se producă beocite mobile.

In secțiunea III sunt încadrate cianobacterii cu trichom helical, având celule izodiametrice, cilindrice sau în formă de disc, neexistând constricție între celulele adiacente, sau aceasta este abia schițată. Reproducerea se realizează prin ruperea transcelulară a trichomului. Exemplul tipic de cianobacterie din această secțiune este *Spirulina* care prezintă trichom mobil, lipsit de teacă sau prezintă o teacă subțire.

Tot în această secțiune sunt cuprinse cianobacteriile cu trichom linear, drept. Reprezentanți tipici pentru această categorie de cianobacterii sunt speciile la care trichomul este alcătuit din celule care au formă de disc, nefiind separate prin constricții profunde, reproducându-se prin ruperea transcelulară a trichomului. La *Oscillatoria*, trichomul este mobil sau are o teacă subțire. Tot trichom mobil are și *Pseudoanabaena*, fiind lipsit de teacă, celulele conținând vacuole polare cu gaze, fiind separate prin constricții profunde. In această secțiune sunt incluse și două grupuri de cianobacterii filamentoase, desemnate grupul A LPP și grupul B LPP, acronimul LPP derivând de la numele genurilor *Lyngbia*, *Phormidium* și *Plectonema*.

La reprezentanții grupului A, trichomul este imobil, închis într-o teacă groasă, prezentând mobilitate numai hormogoniile lipsite de teacă sau cu o teacă subțire.

La reprezentanții grupului B, teaca poate fi prezentă sau absentă, fiind în consecință imobile sau mobile, celulele care formează trichomul fiind izodiametrice sau cilindrice, reproducerea realizându-se prin ruperea transcelulară sau intercelulară a trichomului.

In secțiunea IV sunt incluse cianobacterii a căror reproducere se realizează prin ruperea la întâmplare a trichomului sau prin germinarea akineților. Aici apar diferențieri celulare clare intre celulele trichomului prin prezența heterociștilor. Heterociștii sunt intercalați sau terminali, poziția akineților (atunci când există) fiind variabilă la *Anabaena*, celulele vegetative sunt sferice, ovoide sau cilindrice, pe când la *Nodularia* celulele vegetative au formă de disc.

La *Cylindrosporium*, celulele vegetative sunt izodiametrice sau cilindrice, heterociștii fiind exclusiv terminali, fiind formați la ambele extremități ale trichomului, pe când akineții sunt întotdeauna adiacenți heterociștilor.

Genul *Nostoc* are celulele vegetative sferice, ovoide sau cilindrice, cu akineți (atunci când se produc) formați în lanțuri, de regulă neadiacenți heterociștilor. Hormogoniile dau naștere la filamente tinere cu câte un heterocist terminal la ambele extremități ale lanțului de celule.

La *Scytonema*, trichomul matur este format din celule cu grosime egală, cu heterociști predominant intercalari, cu celule vegetative în formă de disc, izodiametrice sau cilindrice. Hormogoniile dau naștere la filamente tinere cu un heterocist terminal, doar la una dintre extremitățile lanțului de celule. Reproducerea, atât la *Nostoc*, cât și la *Scytonema* se realizează prin ruperea randomică a trichomului, cu și prin formarea hormogoanelor care se deosebesc de trichoamele mature prin absența heterociștilor, mobilitate rapidă prin alunecare, dimensiuni celulare mai mici, forma celulelor și prezența vacuolelor cu gaze.

La genul *Calothrix*, trichomul matur se îngustează de la bază spre apex, la bază fiind prezent un heterocist terminal. Celulele vegetative sunt în formă de disc, izodiametrice sau cilindrice.

În sfârșit, în secțiunea a V-a sunt încadrate cianobacterii precum cele din genurile *Chloroglocopsis* și *Fischerella* care se reproduc prin ruperea la întâmplare a trichomului, formarea de hormogonii și germinarea akineților, atunci când aceștia există.

Cianobacteriile din genul *Gomontiella*, gen descoperit de către marele biolog român Emanoil C. Teodorescu, fondatorul Algologiei românești și al Fiziologiei vegetale, din România, prezintă o structură particulară a celulei, aceasta având forma unui disc cu marginile îndoite spre interior.

Pe lângă faptul că cianobacteriile sunt deosebit de interesante, deoarece ele au fost primele organisme fotosintetizante aerobe care au dat acum 1,8 milioane de ani imensele depozite de stromatolite, studiul lor actual are mare importanță în elucidarea mecanismelor moleculare și celulare ale fotosintezei, în înțelegerea mecanismelor ecologice ale eutrofizării (pe seama lor se realizează „înfloriri“ de ape), în clarificarea mecanismelor de diviziune celulară, precum și în identificarea unor compuși biochimici specifici, cu rol în fotosinteză (ficoeritrina, ficocianina) sau a unor exocrine cu efecte moleculare, celulare și ecologice deosebite. Totodată trebuie menționat faptul că, cianobacterii precum *Anabaena*, *Gloeocapsa* și mai ales *Nostoc* reprezintă veritabile „fosile vii moleculare și celulare“ pentru mașinăria de fixare biologică a azotului molecular care, alături de bacteriile fixatoare de azot din sol sau din nodozitățile leguminoaselor, sunt reprezentanții acelor protobionți care, atunci când în apele oceanului planetar s-a înregistrat sărăcirea în compuși bogați în azot, au diferențiat mecanismele moleculare și celulare ale fixării azotului molecular.

Deosebit de interesante sunt cianobacteriile care realizează, prin simbioze cu ciupercile, o formă nouă de viață-lichenii — un paradox al naturii în care 1+1=1 — precum și cianelele — cianobacterii endosimbionte din *Cyanophora paradoxa*, *Geosiphon*, sau diatomeea *Rhopalodia*, cu o biologie moleculară distinctă, prin al căror studiu s-ar putea înțelege mai mult despre originea celulei eucariote.

Cianobacteriile pot forma numai clorofila a, dar și complexe ficobilină-proteină pigmentară bazată pe ficocianină, ficoeritrină și aloficocianină. Excepție face genul *Prochloron*, acceptat în cadrul cianobacteriilor, dar având multe însușiri comune cu eubacteriile fotosintetizante. Anumite genuri de bacterii glisante, filamentoase, incolore, sunt, din punct de vedere morfologic, foarte asemănătoare cu cianobacteriile — de exemplu, *Beggiatoa* cu *Oscillatoria* — dar, în ciuda nenumăratelor pretenții, nimeni nu a obținut încă o mutantă viabilă incoloră dintr-o formă fotosintetică, evident, colorată!

La cianobacterii se remarcă o largă dependență de CO2, ca sursă de carbon, cu o creștere a importanței căii reductive pentozo-fosfat, în mecanismele biosintetice. La nivel ultrastructural, celula cianobacteriilor este ușor recunoscută, prin prezența tilacoidelor și a corpilor poliedrali. Tilacoidele reprezintă sediul desfășurării proceselor atât în fotosinteză, cât și în respirație. La bacteria fotosintetizatoare *Gloeobacter violaceus*, Rippka și colab., (1974) au constatat un fapt remarcabil, și anume lipsa totală a tilacoidelor. În acest caz, fotosinteza și respirația sunt asociate cu membrana plasmatică (Gauglielmi și colab., 1981). Nu se știe dacă membrana plasmatică joacă acest rol și la cianobacterii.

Corpii poliedrali, numiți astfel după forma lor (Pankratz și Bowen, 1963) sunt acum recunoscuți a reprezenta carboxizomi. Structuri similare au fost descrise la tiobacili și bacterii nitrificatoare (Murray și Watson, 1965). Purificarea acestor carboxizomi a permis identificarea în ei a enzimei RuBPcarboxilaza (Shively și colab., 1973). Ei sunt considerați rezerve celulare de RuBPcarboxilază (RuBP=ribulozo-1,5–bifosfat carboxilază).

La nivel metabolic, distribuția universală de material de rezervă — CIANOFICINĂ, care reprezintă un copolimer de aspartat și arginină, este un caracter unic pentru cianobacterii. Recent, s-a stabilit că ficocianina reprezintă o rezervă de proteine a celulei cianobacteriene și totodată un fotopigment. Acest fapt conferă celulei cianobacteriene capacitatea de a realiza rezerve de azot. Aceasta este o însușire importantă a metabolismului cianobacterian, cu un mare avantaj selectiv potențial, pe care alte procariote nu îl posedă.

La unele cianobacterii, precum *Oscillatoria limnetica*, din Lacul Solar, de la gura Golfului Persic, la Elat (Israel), poate avea loc o veritabilă fotosinteză anoxică. Strategiile metabolice ale acestei cianobacterii în a exploata capacitățile fotosintezei aerobe și anaerobe stau la baza creșterii sale în medii foarte larg fluctuante. Cianobacteria este capabilă de a trece de la o fotosinteză de tip bacterian, dependentă de un anumit fotosistem, la tipul „cloroplastic“ de fotosinteză, evoluând în condiții oxidative și care implică, de fapt, două fotosisteme. Aceasta demonstrează unitatea esențială a procesului fotosintetic și ușurința tranziției dintre cele două tipuri de fotosisteme, cu utilizarea energiei luminoase și a moleculelor transportoare de electroni. Acesta este un aranjament pentru faimoasa ipoteză unificatoare a lui van Niel, în care toate reacțiile din procesul de fotosinteză sunt văzute ca având un mecanism de bază comun.

În anul 1968, Fay și colaboratorii au emis ipoteza că heterocistul reprezintă celula înalt specializată în fixarea azotului molecular, la cianobacterii.

În anul 1969, Wyatt și Silvey au dovedit că și cianobacteria unicelulară *Gloeocapsa*, care nu diferențiază heterociști, are capacitatea de a fixa azotul molecular. Ulterior, Stewart și Lex (1970) dovedesc că și *Plectonema boryanum*, o cianobacterie filamentoasă, care, de asemenea, nu diferențiază heterociști, este capabilă de a avea activitate nitrogenazică, adică de a fixa azotul molecular, dar numai în condiții anaerobe și microaerobice. Aceste date au făcut ca să devină caducă teoria potrivit căreia prezența heterocistului este o condiție *sine qua non*, adică esențială pentru fixarea azotului.

Totuși, heterocistul este cerut în mod obligatoriu pentru fixarea azotului molecular, în condiții aerobe, el asigurând crearea unui situs microaerobic, în cadrul filamentului, în care nitrogenaza poate fi activă în fixarea azotului molecular.

Dezvoltarea heterociștilor și a akineților (celule mari, specializate în reproducerea vegetativă, asexuată, necunoscându-se reproducerea sexuată la aceste microorganisme), celule care, față de celulele vegetative, prezintă modificări structurale și specializări funcționale, ilustrează cea mai importantă caracteristică a cianobacteriilor comparativ cu alte procariote, deoarece la nici un alt tip de procariot nu se întâlnește un grad echivalent de diferențiere și dezvoltare celulară, așa cum se întâlnește la cianobacterii.

Cianobacteriile mai prezintă și alte procese de citodiferențiere, precum sunt formarea hormogoanelor, dezvoltarea perilor celulari și apariția schimbărilor asociate ciclului celular.

Formarea heterociștilor și a akineților este supusă unor restricții de mediu și unui control strict. Ca și în cazul tuturor celorlalte tipuri de diferențiere de la procariote, începutul diferențierii acestor celule ale cianobacteriilor este determinat de condițiile de mediu. Aceasta este în contrast cu situația diferențierii întâlnite la organismele superioare care, în mod frecvent, este înnăscută sau obligat integrată în secvențele celulare. În cadrul impunerii unui anumit pattern ordonat al heterociștilor, ca răspuns la limitarea de azot, se realizează un răspuns al întregului filament, la schimbarea de mediu.

Gradul de ordine al diferențierii celulare ce conduce la menținerea, pe măsură ce are loc creșterea, a unui pattern de control strict al heterociștilor, de-a lungul întregului filament, produce ceea ce s-ar putea considera a fi o structură multicelulară. Astfel, un filament de celule vegetative poate să schimbe din câteva sute de celule, în esență independente, în două tipuri de populații care sunt virtual interdependente și care au roluri și trăsături foarte diferite. Gradul exact de independență al celulelor ce alcătuiesc filamentele nediferențiate trebuie analizat cu precauție, de vreme ce acum se știe că există interacțiune evidentă dintre componentele acestor filamente. De fapt, interacțiunea dintre indivizii populațiilor de cianobacterii poate fi generală, în special atunci când indivizii sunt menținuți împreună într-un matrix sau teacă galerctică, mucilaginoasă, precum la *Aphanothece stagnina, Nostoc* sp. și *Rivularia* sp.

Cianobacteriile care manifestă unele dintre atributele organismelor multicelulare se dovedesc a fi excelente sisteme experimentale pentru studiul activităților intercelulare, la nivelul bazal, cel mai simplu.

Se admite că, în general, prezența cianobacteriilor cu heterociști într-o populație naturală, reflectă o deficiență relativă a azotului combinat, în mediul respectiv și în populația considerată.

Abilitatea de a interpreta trăsăturile fizice și chimice ale mediului prin observarea cianobacteriilor dominante, care sunt prezente în habitate naturale este, evident, de o importanță covârșitoare pentru managementul lacurilor, bazinelor piscicole și câmpurilor cu orez. Din păcate, se cunosc foarte puține lucruri despre diferențele fiziologice dintre genurile principale de cianobacterii, de exemplu: *Anabaena, Anabaenopsis* și *Aphanizomenon*, din lacuri, și dintre *Anabaena, Aulosira, Cylindrospermum* și *Gloeotrichia*, din câmpurile de orez.

Cercetările lui Kratz și Myers (1955), care au descris condițiile în care se poate realiza o creștere rapidă ce permite și o caracterizare a comportamentului fiziologic fundamental, la trei specii de cianobacterii, au fost cruciale în stabilirea unui organism experimental major, reprezentat de *Anacystis nidulans*. Trecerea speciilor de cianobacterii din mediile lor naturale, în condiții de laborator este dificilă. Trebuie realizat un studiu temeinic și critic al menținerii stabilității genetice a tulpinilor de laborator, cu care se întreprind studii.

Studiul cianobacteriilor poate aduce multe surprize pentru știință. Un singur exemplu este suficient pentru a ilustra această afirmație: cercetările clasice ale lui Geitler (1932), reluate cu mijloace moderne, au dovedit că cele mai multe cianobacterii dintre Oscillatoriaceae au trichome de 100μm lățime. Numai specia *Starria zimbabweensis* are trichome triradiate, în secțiune (Lang, 1977), și o astfel de formă a fost identificată până în prezent, doar dintr-o singură stațiune. Mediile tropicale cu ploi abundente oferă condiții excelente pentru dezvoltarea masivă a cianobacteriilor și se întrezărește că pietrele permanent umede din aceste regiuni reprezintă suport pentru nenumărate specii de cianobacterii, neidentificate încă de știință. Oricum, în precambrian, când nu se diferențiase marea majoritate a algelor eucariote, iar consumatorii erau în anumite medii inexistenți, cianobacteriile nu au avut concurenți, dezvoltându-se luxuriant și dând faimoasele depozite de stromatolite.

Simbiozele cele mai frecvente realizate de cianobacterii sunt cele cu coralii și cu lichenii ce conțin alge verzi, dar ele pot realiza simbioze cu sau pot fi legate de o gamă largă de alte organisme, precum algele verzi, diatomeele, mușchii Hepatice, mușchii Briophyta, ferigile, cicadele, angiospermele, ficomicetele, ascomicetele, protozoarele, spongierii, briozoarele, echiuridele, viermii, opistobranchiatele, ascidii didemnide și chiar cu mamiferele (leneșul).

Sunt descrise, de asemenea, simbioze laxe dintre cianobacterii și alte procariote. Cianobacteriile pot fi simbionte extra- sau intracelulare și pot oferi sau pot primi de la alte organisme carbonul organic dizolvat. Acolo unde ele pot realiza fixarea azotului molecular se pare că acesta este trecut la alte organisme.

Endosimbionții cianobacterieni intracelulari sunt și mai interesanți și ei stau la originea cianelelor actuale, precum sunt cele din *Cyanophora paradoxa* și *Glaucocystis nostochinearum*. Probabil, cu mult mai timpuriu în evoluție, acestea au stat la originea cloroplastelor adevărate.

Cel puțin doi simbionți intracelulari cianeli moderni pot fixa azotul și de aici apare ciudățenia că totuși, toate cloroplastele sunt lipsite de capacitatea de a fixa azotul.

Organismele fotosintetizatoare asociate simbiotic cu ascidiile didemnide sunt deosebit de interesante. Unele dintre acestea par a fi cianobacterii tipice (Kott, 1980), pe când altele sunt organisme procariote care produc clorofila b și care sunt lipsite de ficobilină, aparținând genului *Prochloron* (Lewin, 1977). Și alte caracteristici separă acest gen de restul cianobacteriilor, printre care stivuirea de tilacoide și prezența unei zone centrale în celulă lipsită total de tilacoide (Whatley, 1977). Acest gen a fost inclus într-un filum nou, separat, denumit Prochlorophyta (Lewin, 1976). Cum didemnidele sunt relativ tinere, în termeni evolutivi, *Prochloron* trebuie că a existat anterior, fie ca organism liber, fie că el a apărut din acel moment. *Prochloron* a derivat dintr-o cianobacterie tipică, dar a dobândit capacitatea de a sintetiza clorofila b, fie printr-o evoluție moleculară din clorofila a sau din precursorul său, sau printr-un transfer întâmplător, pe orizontală, de informație genetică relevantă pentru clorofila b, de la o oarecare algă verde. Ca o consecință a prezenței clorofilei b, celelalte schimbări evolutive reprezentate de pierderea ficobilinelor și schimbarea aranjamentului tilacoidelor ar fi putut să fie realizate rapid. Dacă admitem că *Prochloron* stă la originea endosimbiotică a cloroplastului, atunci este ilogică ipoteza transferului orizontal al genei pentru clorofila b, fiind mult mai plauzibilă ipoteza mutagenezei spontane a derivării clorofilei b din clorofila a.

Dacă acolo unde trăiesc aceste organisme fotosintetizatoare (rocile umede spălate de flux și reflux din zonele tropicale) există pentru aceste procariote un puternic avantaj selectiv de a poseda clorofila b, în loc de pigmenți ficobilinici, atunci aceste procariote se dezvoltă abundent în apele salmastre marine. Dacă se acceptă că *Prochloron* este o cianobacterie și nu introdus într-un filum separat, reprezentat doar de el, atunci limitele descriptive ale cianobacteriilor sunt mult extinse, așa cum apreciază Sewaldt și Stackebrandt (1982) bazați pe studiul secvențelor de ARN ribozomal.

Biomasa de *Spirulina* din lagunele mexicane și taiwaneze, precum și din lacul Ciad, din Africa ecuatorială, este utilizată sub formă de turte, în hrana umană. Ea este considerată a juca un rol major ca substituent de proteine, în hrana vacilor și oamenilor. După unele cercetări japoneze și nord americane, *Spirulina* ar avea unele proprietăți curative importante. Cianobacteriile sunt considerate o sursă importantă de extracție a unor componente de înaltă valoare precum ficobilinele, utilizate în colorarea alimentelor, ceea ce este deosebit de important, știut fiind faptul că substanțele colorante de sinteză, utilizate în industria alimentară, au efecte secundare nedorite.

Nu este exclusă posibilitatea ca genele implicate în fixarea azotului, la aceste cianobacterii, să poată fi transferate în celula vegetală, mai curând decât genele de la bacteriile fixatoare de azot. Cianobacteriile fixatoare de azot sunt deja utilizate sub formă uscată, alături de alți fertilizatori, în câmpurile de orez. Asemenea cianobacterii sunt crescute în condiții semiamenajate din bălțile mici, existente în unele sate. De asemenea, sunt interesante cercetările privind optimizarea fixării azotului molecular de către *Anabaena azollae*, care crește ca simbiont în feriga *Azolla* (Lunpkin și Pleicknett, 1980).

Cercetările lui Johnson și Glover (19981) au arătat că producția planctonică oceanică este în cea mai mare parte asigurată de cianobacteriile cu celulă mică, schimbându-se astfel totalmente imaginea anterioară asupra importanței la scară planetară a producătorilor primari din oceane. Într-adevăr, cercetările de dinainte de 1979, realizate cu filtre de dimensiuni mari, scoseseră în evidență rolul major al altor grupe de microorganisme fotosintetizatoare din oceane și anume al celor de dimensiuni mari, recoltate cu filtre prea grosiere, cu care se analizau apele oceanului planetar, în cadrul Programului Biologic Internațional de studiu al productivității primare a bazinelor acvatice. Milioane de dolari s-au cheltuit pe analiza conținutului în clorofilă cu intenția de a măsura productivitatea biologică. Acum se știe că acesta a fost un drum greșit în cercetarea mondială, că cea mai mare importanță în productivitatea primară a oceanelor o are nanoplanctonul reprezentat în cea mai mare parte de cianobacterii unicelulare de dimensiune mică.

Sunt mari dificultăți în stabilirea statutului taxonomic al cianobacteriilor, în special în acordarea denumirii lor, după Codul Botanic. Nu poate fi evitat acest cod, atunci când se urmărește realizarea unei listări floristice din diferitele comunități ale organismelor, dar absența unui holotip viu face acest sistem de clasificare de o redusă valoare pentru multe dintre studiile moderne, critice. Din această cauză, și din multe altele, Stainer și colab. (1978) au propus ca cianobacteriile să fie tratate în conformitate cu convențiile Codului Bacteriologic. Oricum, diversitatea tipurilor morfologice de cianobacterii este impresionantă, atât a formelor unicelulare, cât și a celor filamentoase.

Emanoil Teodorescu a descoperit în lacurile sărate din nordul Dobrogei un gen și o specie de cianobacterie pe care a botezat-o *Gomontiella subtubulosa* care are filamentul alcătuit din celule semilunare, de forma unui jgheab, cu marginile apropiate, configurație care permite reținerea apei, prin forțe capilare, și în cursul perioadelor secetoase. Această cianobacterie are hormogonii și diferențiază heterociști.

2. ASPECTE ALE CITODIFERENȚIERII LA CIANOBACTERII

Proprietățile comune cianobacteriilor sunt următoarele: fotosinteză aerobă, adaptare cromatică, capacitate de a fixa azotul molecular și capacitatea pentru diferențiere celulară. În cadrul acesteia din urmă, din celulele vegetative se diferențiază heterociști, akineți, beocite și hormogoane.

Hormogoanele reprezintă filamente scurte, formate din celule nediferențiate. Ele sunt caracteristice cianobacteriilor filamentoase și prin asemenea hormogoane, cianobacteriile filamentoase se înmulțesc. La *Oscillatoria* și *Cylindrospermum*, hormogoanele se formează prin dezintegrarea de filamente întregi, pe când la formele pseudoramificate precum *Scytonema* și *Stigonema*, ele se formează la punctul de origine al pseudoramificației. În unele cazuri, ruperea trichoamelor (filamente lungi) se realizează prin diferențierea din loc în loc, de-a lungul unui filament care a atins lungimi maximale, a unor celule specializate, numite **necridii** sau **necrocite**. Acestea devin biconcave, datorită lizei și deshidratării și la nivelul lor are loc fragmentarea trichomului cu eliberarea de hormogoane. De regulă, hormogoanele se desprind din cadrul filamentului inițial, înainte de a deveni filamente noi, dar pot uneori să germineze in situ, în cadrul tecii filamentului parental.

Formarea de necridii (necrocite) reprezintă manifestarea fenomenului de moarte celulară programată genetic (*apoptoză* sau *tanaptoză* celulară) și considerăm că cianobacteriile reprezintă cel mai primitiv grup de organisme la care apare acest fenomen asociat aceluia de citodiferențiere.

Hormocistele sunt filamente scurte, alcătuite din celule cu un bogat conținut granular, înconjurate de o teacă condensată comună, reprezentând un intermediar între hormogoane și akineți. Ele se dezvoltă fie terminal, fie intercalar, așa cum este cazul speciei *Westiella laminosa*. Ele se desprind din filamentul principal, prin ruperea acestuia, și apoi pot germina la unul sau ambele capete (Allsopp, 1968).

Exosporii și endosporii sunt produși ai fisiunii celulare, fiind caracteristici pentru două ordine de cianobacterii: Chamaesiphonales și

Pleurocapsales (Waterbury și Stanier, 1978). Exosporii iau naștere prin clivări succesive din polul apical al unei celule vegetative alungite (ca la *Chamaesiphon*). Endosporii sunt caracteristici genului *Dermocarpa*, un alt reprezentant al ordinului *Chamaesiphonales*, și iau naștere prin fisiunea multiplă a unei celule vegetative mari, de formă sferică, fiind ulterior eliberați prin ruperea peretelui parental, formând eventual noi celule vegetative. Toți membrii ordinului *Pleurocapsales* se reproduc prin acest mecanism de fisiune multiplă și eliberare de endospori. Waterbury și Stanier (1978) au utilizat termenul de **beocit** pentru endosporul caracteristic reprezentanților ordinului Pleurocapsales.

În descrierile timpurii despre cianobacterii, Geitler (1932) a utilizat termenul de **akineți** pentru o varietate de cianobacterii, incluzând forme unicelulare. După aceste descrieri, cianobacteria *Chlorogloeopsis fritschii,* în condiții nepropice de creștere, suferă o schimbare de la un tip celular aseriat sau filamentos, la un tip morfologic de celulă unică, mare, care a fost numit **akinet. Akineții** sunt celule specializate, mult mai mari decât celulele vegetative, cu dimensiune variabilă, chiar în cadrul uneia și aceleiași culturi. Akineții au aspect granular, mai ales atunci când sunt vizualizați la microscopul optic, datorită acumulării unui număr mare de granule de cianoficină. Forma akineților este, de asemenea, variabilă. La *Anabaena cylindrica* akineții au formă alungită, pe când la o altă specie de *Anabaena*, desemnată CA, aceștia au formă aproape sferică.

Akineții au fost descriși pentru prima dată de către Carter, în anul 1856. El a observat aceste celule mari, granulare, pe care le-a numit sporangium, care întotdeauna se dezvoltă lângă un heterocist.

Diferențele majore dintre akineți și celulele vegetative fac ca aceștia să fie ușor observați la microscopul optic. Akinetul este de obicei mai mare, peretele său celular mai gros, citoplasma sa este mai granulară decât a celulei vegetative. Creșterea în abundență a granulelor de cianoficină și mărirea celulei vegetative sunt semnele începutului diferențierii akineților, la *Cylindrospermum sp.* În stadiile mai avansate ale diferențierii, akinetul acumulează un înveliș fibros între stratul exterior al peretelui celular și teacă, după care are loc depunerea unei substanțe electrono-dense, în cadrul învelișului fibros.

La *Nostoc* nu se remarcă o modificare vizibilă a corpilor poliedrali și lipidici, precum nici a conținutului în poliglucozide, în cursul diferențierii akineților. Cele mai pronunțate schimbări sunt reprezentate de creșterea de peste opt ori a conținutului în granule de cianoficină per celulă și o creștere de peste 16 ori a conținutului de glicogen per celulă. Se dublează valorile per celulă la greutatea uscată totală, la conținutul de carbon și de clorofilă a, conținutul în azot crește cu 17%, iar ficocianina rămâne neschimbată.

Și la *Anabaena* s-a descris acumularea de glicogen ce însoțește diferențierea akineților (Sarma și Kantu, 1979).

Akineții sunt corpuri de propagare care prezintă rezistență față de condițiile de mediu adverse, fiind comparabili cu endosporii bacterieni. Prin transferul akineților maturi pe mediu de cultură proaspăt are loc germinarea acestora.

Akinetul germinat prezintă un singur por ce apare la un capăt prin care germenul iese, după ce a suferit una sau doua diviziuni celulare. Poate avea loc diviziunea și după ce germenul iese din akinet. Există și probabilitatea ocazională de a se realiza dizolvarea întregii membrane a akinetului în fragmente globulare sau baghetiforme.

La *Anabaena doliolum* se remarcă conversia totală a celulelor vegetative în akineți. După trecerea culturii sincronizate de akineți de la lumină la întuneric și apoi revenirea la lumină, după 3–4 zile de întuneric, 90% dintre akineții diferențiați la întuneric au germinat, prin desfășurarea primei diviziuni celulare, la 72–80h. ordinea sintezei macromoleculare a fost: ARN, la 4h, și a continuat până la 20h, clorofila a, la 8h, ficocianina, la 12h și ADN, la 24h.

Cea mai caracteristică diferențiere celulară a celulei cianobacteriene este reprezentată de heterocist. El reprezintă o celulă cu structură de suprafață masivă și un conținut celular dens, lipsită însă de incluziuni celulare specifice celulelor vegetative. Fibrilele de ADN sunt dificil de evidențiat, iar ribozomii sunt uniform distribuiți în citoplasmă. La nivelul său, tilacoidele apar ca un sistem reticulat de membrane cu configurație încolăcită.

Heterocistul se diferențiază dintr-o celulă vegetativă, special programată, prin acumularea unui conținut bogat de acizi nucleici și proteine. Asemenea componente sunt inițial distribuite cvasiuniform, pentru ca, pe măsura desfășurării procesului de diferențiere, asemenea substanțe să se concentreze în regiuni distincte polare, pentru a trece prin porii heterocistului matur (situați diametral opus, spre celulele vegetative învecinate) în celulele vegetative din nemijlocita vecinătate. Asemenea particularități structurale ale heterocistului asigură, pe de o parte, rezistența sa la atacul cianofagilor, iar pe de altă parte crearea unui spațiu hipoxic, propice desfășurării activității nitrogenazei.

La microscopul fotonic, heterociștii pot fi deosebiți de celulele vegetative deoarece ei sunt mai mari, au învelișul extern mai gros, prezintă granulație refringentă la locul de joncțiune cu celulele vegetative adiacente, nu au citoplasma diferențiată în centroplasmă și cromoplasmă.

Heterociștii prezintă un sistem membranar hipertrofiat (fig. 1). Poziția lor este variabilă de-a lungul trichomului; pot apare fie intercalar (*Nostoc*, *Anabaena*), când au doi granuli polari diametral opuși sau doar terminal

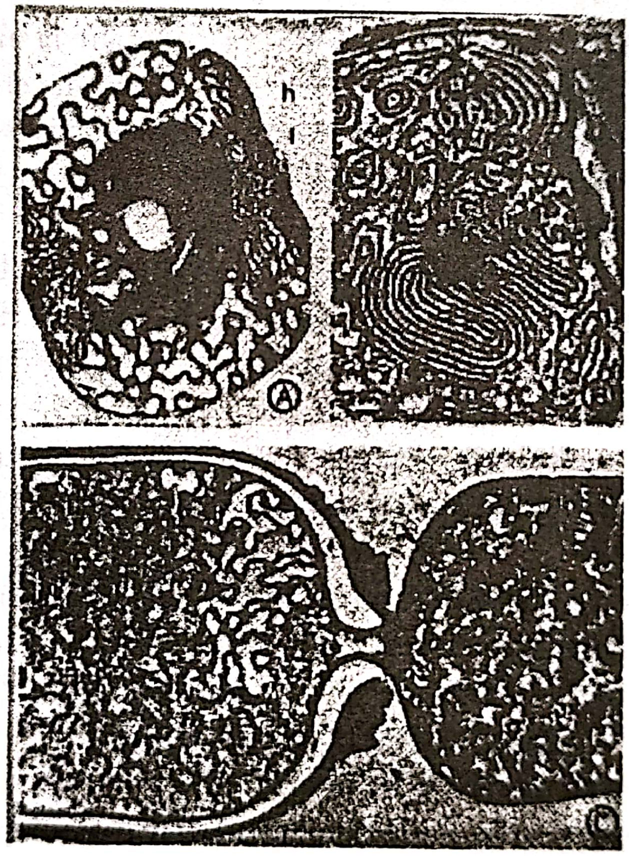


Fig. 1 — *Anabaena cylindrica* evidențiată electromicroscopic:

A. secțiune cvasimediană prin heterocist;
B. secțiune în regiunea polară a heterocistului în care apar sisteme membranare concentrice în contact cu structura „fagure de miere"; cu stratul omogen (h) și cu stratul laminar (l);
C. joncțiunea dintre heterocist (stânga) și celula vegetativă proximală (dreapta) (după Lang și Fay, 1971).

(*Rivularia*), caz în care au un singur granul polar, la polul de contact cu celula vegetativă, granul reprezentat de o acumulare de cianoficină. Heterociștii sunt celule înalt diferențiate care și-au pierdut capacitatea de reproducere și care se află în contact strâns cu celulele vegetative imediat învecinate din filament, prin intermediul unui canal îngust și al unui sept fin.

In cadrul unui hormogon, dispoziția heterociștilor este aproape invariabil intercalară, în timp ce în trichomul matur aceștia au o dispoziție intercalată, terminală sau laterală (fig. 2).

Nu orice celula vegetativă se poate transforma în heterocist; diviziunea celulară trebuie să fie asimetrică și doar celulele mici, rezultate din diviziune se pot diferenția, după o creștere prealabilă, în heterociști. Absența competenței de diferențiere spre heterociști se atribuie stabilirii unui gradient de inhibiție pe oricare dintre laturile celulei. Numai când celula este plasată în afara zonei de inhibiție, aceasta se poate diferenția în heterocist. Formarea heterocistului poate dura în jur de 24 ore.

Poziția și frecvența heterociștilor este dependentă de concentrația unei substanțe (probabil amoniu), produsă de heterociștii preexistenți, care trebuie să scadă sub un anumit nivel limită. S-a afirmat că există un determinism genetic al poziționării heterociștilor în cadrul trichomului.

In primele etape ale diferențierii heterociștilor există posibilitatea reversiei acestora în celule vegetative, dar în stadiile târzii, evoluția spre heterociști

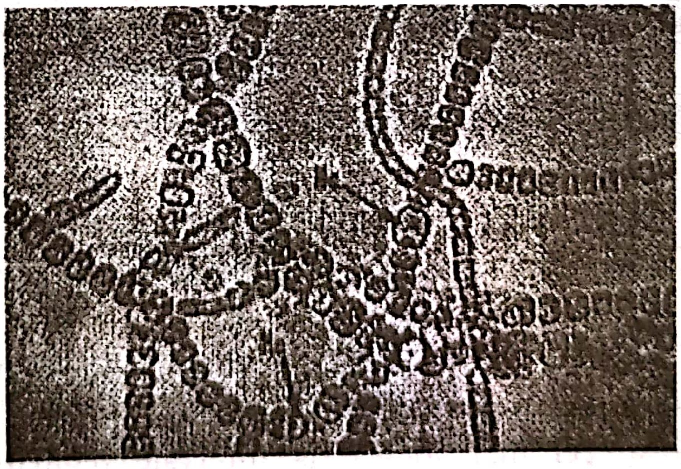


Fig. 2 — *Fischerella* tulpina 29538 ATCC este o cianobacterie cu trichom parțial multiseriat și ramificații laterale producătoare de heterociști (Hc) (după Stanier și G. Cohen-Bazire, 1977).

este ireversibilă. In heterociști, variatele procese metabolice ale celulei vegetative sunt oprite, probabil prin controlul transcrierii.

Unele componente ale celulei vegetative aflate în curs de diferențiere în heterocist, precum granulele de polifosfat, glicogenul, ficocianina, etc., sunt degradate, iar materialele rezultate din acest proces sunt refolosite pentru edificarea noilor structuri ale heterocistului, reprezentate de un sistem lamelar abundent, de granule polare de cianoficină și de un înveliș celular gros. Nu s-a evidențiat ADN în heterocistul matur (Stanier, 1977). Stanier consideră că heterocistul reprezintă echivalentul procariot al eritrocitului de la mamifere.

Heterociștii au un sistem fotosintetic simplificat, comparativ cu cel al celulelor vegetative, deoarece din el lipsesc pigmenții accesorii ai fotosistemului II, ficocianina și aloficocianina, clorofila a, în timp ce componentele sistemului I sunt funcționale.

Neavând componentele sistemului II, heterociștii nu realizează fotoliza apei, sunt deficienți în Mn^{2+} și nu posedă o proteină clorofiliană complexă (Stewart, 1980). Datorită deficienței de pigmenți fotosintetizanți, heterociștii nu fixează CO_2. Compușii cu carbon, necesari proceselor energetice, inclusiv fixării N_2, sunt importate din celulele vegetative învecinate, sub formă de maltoză (Stewart, 1980).

In filamentul de cianobacterii se observă o simbioză intercelulară între heterociști, care furnizează compuși cu azot, și celulele vegetative învecinate, care furnizează metaboliți organici și probabil ATP.

Heterociștii posedă o înaltă activitate a enzimelor oxidative ale căii pentozo-fosfat și sunt sediul principal al activității nitrogenazei, reprezentând structuri specializate ale procesului de diferențiere celulară în care se face fixarea azotului molecular.

Heterociștii pot fi celule de rezistență, dar și punctul de minimă rezistență unde se rup filamentele și, prin fragmentare, pot contribui la înmulțirea vegetativă și la răspândirea cianobacteriei.

Heterociștii impun o anumită simetrie filamentului, de vreme ce ei apar în locuri precise, terminal (la capetele filamentului), bazal (la un capăt al unui trichom) și, cel mai adesea, la intervale regulate în interiorul filamentului. Analiza akineților situați fie adiacent heterocistului, fie la mijlocul distanței dintre doi heterociști, a sugerat că alături de prezența unor gradienți de maturizare a akineților (cauzați probabil de diferențe în timpul de inițiere a dezvoltării lor) există o anumită formă de reglare topologică a diferențierii acestor celule specializate, în cadrul trichomului cianobacterian.

Nu au fost încă descrise mutante cu pattern alterat de akineți. Au fost însă descrise asemenea mutante incapabile de a forma akineți, unele apărând spontan, altele induse prin tratament cu UV sau nitrosoguanidină.

Analogul triptofanului, 7–azatriptofanul, induce o schimbare remarcabilă în modelul heterociștilor la *Anabaena*, crescând frecvența heterociștilor și determinând formarea de heterociști multipli, adiacenți (Mitchison și Wilcox, 1973). Această reducere în regularitatea pattern-ului spațial al heterociștilor existenți și în diferențiere a fost observată și la *Nostoc* 7524 (Sutherland și colab., 1979).

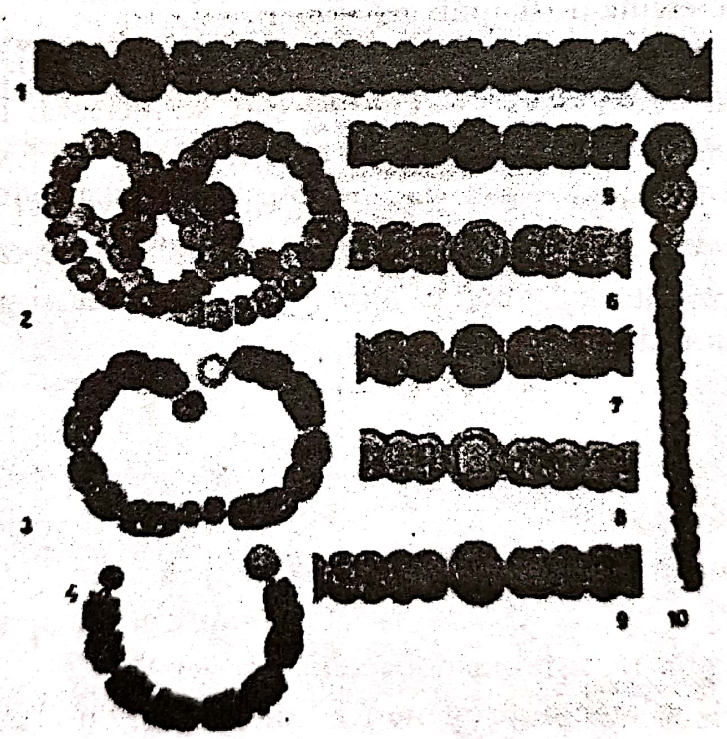


Fig. 3 — Heterociști la diferite specii de *Anabena: A. solitaria* (1, 5-9), *A. spiroides* (2), *A. constricta* (3), *A. circularis* (4) și *A. sphaerica* (10).
În 1, 5-9, dimensiunea heterocistului este mai mare decât dimensiunea celulelor vegetative, pe când în 2-4 și 10, dimensiunea heterocistului este mai mică decât a celulelor vegetative. Celulele terminale din 10 sunt mult mai mari decât oricare altă celulă a filamentului și ar putea reprezenta akineți. În 4, celula terminală din ramura stângă a trichomului este o necrocită (original Gavrilă, din Mihăescu și Gavrilă, 1989).

Un efect similar se înregistrează în pattern-ul diferențierii akineților, aceștia formându-se în mod normal la mijlocul distanței dintre heterociști. Adăugarea de 7–azatriptofan la culturile fixatoare de azot a inhibat fixarea azotului și, în consecință, dezvoltarea akineților.

Modelul spațial de formare a akineților este alterat în mod specific și de analogul argininei, canavanina. Prezența a 40μM canavanină în culturile fixatoare de azot ale speciei *Anabaena cylindrica*, la începutul formării akineților, a determinat apariția la întâmplare a acestora între heterociști, pe lângă locul obișnuit în care ei se formează.

Proprietățile generale ale cianobacteriilor le fac să fie obiecte de studiu deosebit de atractive pentru cercetările genetice. Pe lângă acestea, se mai remarcă creșterea rapidă, formarea de suspensii omogene în mediul lichid de cultură, viabilitate reproductibilă pe plăci, ușurința pentru replica plating și frecvența crescută de schimb genetic.

Dificultățile persistente sunt legate însă de neidentificarea statutului taxonomic al unora dintre speciile cu care se lucrează. Bunăoară, sușa denumită *Anacystis nidulans* (Tx20, UTEX 625 și UTEX 1550) își are originea într-un singur izolat realizat de Kratz și Myers (1955) împreună cu *Synechococcus leopoliensis* CCAP 1401/1 și *Synechococcus* PCC 6301 (ATCC 27144) și s-a dovedit că reprezintă una și aceeași specie, deci cele trei forme sunt identice.

3. GENOMUL CIANOBACTERIAN

Genomul celulei cianobacteriene este alcătuit din două categorii de determinanți genetici: genele esențiale, (genomul cianobacterian propriu-zis), localizate în cromozomul cianobacterian și genele accesorii, prezente în plasmide, în elementele genetice mobile și în cianofagi (fagii cianobacteriilor).

Cromozomul cianobacterian este o moleculă circulară dublu-catenară de ADN, reprezentând genoforul pentru unicul grup de lincaj. Dimittieva și Kozlov (1979) au izolat cromozomul circular, pliat, al cianobacteriei *Anabaena variabilis.* Delaney și Carr (1975) au adus unele date privind bidirecționalitatea replicării cromozomului cianobacterian. Cromozomul cianobacterian este localizat la nivelul nucleoidului cianobacterian și se confundă, în fapt, cu acesta, apărând în zona centrală a celulei și se prezintă la nivel electronomicroscopic ca o rețea tridimensională de fibrile fine de ADN, iar la nivel de microscopie optică ca o zonă incoloră (Feulgen negativă) din centrul celulei, prezentând diferite stadii ale diviziunii și segregării sale, asociate sciziparității celulei cianobacteriene (fig. 4)

Proteinele bazice cu GM mică (10.000 daltoni), descrise la *Anabaena* și *Aphanocapsa* ca fiind asociate ADN cianobacterian, nu sunt histone, ci **histone-like**, semănând mai curând cu proteinele HU (**helix unwinding**) descrise în asociere cu cromozomul bacteriei *Escherichia coli* sau al arhebacteriei *Thermoplasma acidophilum* (Rouviere Janiv și Gros, 1976). Asemenea proteine au fost identificate și la *Synechocystis* PCC. Ele au o greutate moleculară mică, de sub 10.000 daltoni. Aceste proteine se leagă puternic la ADN, sunt solubile în acizi și au o compoziție în aminoacizi asemănătoare proteinei „**HU**“ izolată din bacteria *E. coli* și cianobacterii, și care este similară cu aceea a fracțiunii histonice H_2B. Din punct de vedere imunologic, aceste proteine sunt identice cu histonele. Însă ele nu sunt omoloage histonelor tipice ale eucariotelor, atât calitativ cât și cantitativ,

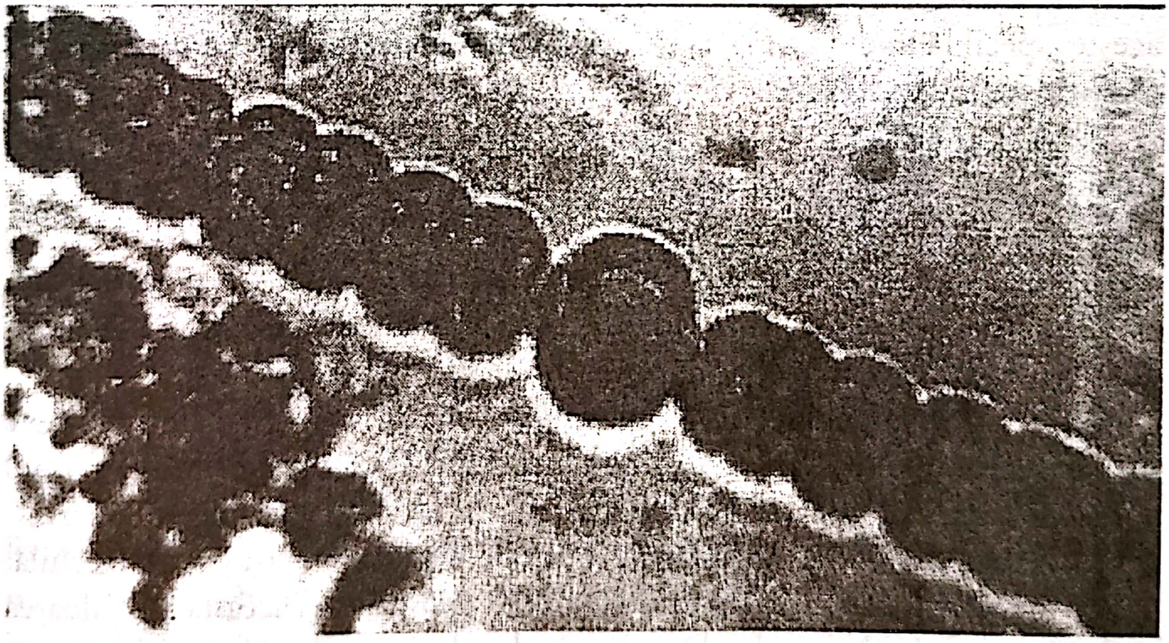


Fig. 4 — Celule vegetative și un heterocist intercalat într-un filament (trihom) de *Nostoc* sp. (original).

știut fiind faptul că la eucariote, raportul ADN/histone este de 1:1. Ele îndeplinesc același rol pe care îl au histonele eucariotelor și anume neutralizarea încărcăturii electrice negative a ADN, după toate probabilitățile, nefiind implicate în mecanisme reglatoare. Analiza chimică a ADN de la *Plectonema boryanum* a evidențiat prezența în acesta a unor mici cantități de baze azotate metilate, precum 5–metil citozina și 6–metil aminopurina (Walk, 1973). La *Anacystis nidulans* raportul A:G:C:T este 23,3; 29,5; 24,8; 22,3. Raportul A/T=1,04, raportul G/C=1,08, iar raportul Purine/Pirimidine este de 1,04, ceea ce denotă dublu-catenaritatea ADN cianobacterian.

La formele unicelulare, conținutul G+C variază între 35% și 71%, iar pentru formele filamentoase, aceste valori se înscriu între 38% și 51%. Aceste limite largi de variabilitate în conținutul G+C din ADN cianobacterian sunt luate drept argument pentru originea polifiletică a cianobacteriilor din grupul *Chroococcales*.

Grupul hormogonalelor (filamentoase) este mai conservator și a suferit în decursul evoluției divergențe genetice neînsemnate.

La *Agmenellum quadruplicatum*, s-au determinat un conținut G+C de 48% și o cantitate de ADN, de 1,3x109 daltoni, considerându-se că aceasta ar avea semnificația unei stări poliploide, afirmație susținută de rezistența acestei specii la iradierea UV și de dificultatea obținerii de mutante recesive (Roberts și colab., 1975).

Pe baza analizei cineticii renaturării ADN, Herdman și Carr (1974) au stabilit că greutatea moleculară a genomurilor de *Anacystis nidulans* și *Anabaena cylindrica* este de 2,27x109, respectiv 2,47x109 daltoni ceea ce o apropie de aceea a bacteriei *Escherichia coli*, care este de 2,4x109 daltoni.

Cele mai riguroase date de analiză a secvențelor de nucleotide din ADN cianobacterian nu au evidențiat prezența secvențelor repetate.

Interesante sunt datele care evidențiază un anumit grad de omologie dintre secvențele de ADN de la unele specii de cianobacterii, din grupul *Oscillatoria* și cele din ADN cloroplastic din cloroplastele algelor verzi.

La A. nidulans a fost estimată o cantitate de 3,6x 10–14 g ADN/celulă, mult superioară celei de la bacteria *Bacillus subtilis*, la care aceasta are valoarea 1,9x10–14 g ADN/celulă. Densitatea de plutire a ADN de *Plectonema boryanum* este de 1,707 g/cm3. Valorile acestui parametru la reprezentanții unicelulari variază între 1,649g/cm3 și 1,730g/cm3, pe când la

Oscillatoriales, limitele de variație sunt mult mai strânse: 1,704—1,710g/cm3 (Edelman și colab., 1967).

Unele specii de *Calothrix* și *Scytonema* conțin cele mai mari genomuri dintre procariote, apropiindu-se de acelea ale unor eucariote unicelulare primitive.

Cantitatea de ADN din akineți este de aproximativ 30 de ori mai mare decât în celula vegetativă la *Cylindrospermum* sp., pe când la *Anabaena cylindrica*, conținutul de ADN este oarecum egal cu acela din celulele vegetative aflate în stare exponențială de creștere și echivalând cu aproximativ 57 de copii genomice. In akineți se află de 4 ori mai mult ARN și de 3 ori mai multe proteine decât în celula vegetativă.

ARNr la cianobacterii este de tip 16S, 23S și 5S, iar ribozomii sunt de tip 70S, cu subunități de 30S și 50S.

Secvența de nucleotide a ARNr 5S a fost determinată la *Anacystis nidulans.* Analiza comparativă a acestuia, la cianobacterii, bacterii și eucariote a evidențiat caracterul foarte divergent al cianobacteriilor și similitudini clare cu bacteriile și din acest punct de vedere.

În ARN de *A. nidulans* s-a pus în evidență prezența unei baze azotate atipice și anume 2–0–metilribozocitozina. ARNt de la această cianobacterie are marcante asemănări cu cel de la bacteriile *E.coli* și *B. subtilis* (Escarot și colab., 1976).

Sinteza ADN are loc la lumină și este inhibată la întuneric și sincronizarea ei se realizează prin alternarea luminii cu întunericul în regim de 12 h (Asato și Folsome, 1970). ADN este sintetizat periodic, în 60 de minute din cele 120 ale ciclului celular estimat de Herdman și colab. (1970). Incorporarea de timidină tritiată (H^3-timidină) în regiunea nucleoidului heterociștilor este legată de sinteza reparatorie sau amplificarea zonală, probabil a sectorului purtător al cistronilor nitrogenazei.

Cianobacteriile se reproduc prin diviziune simplă care începe prin diviziunea nucleoidului și separarea diafragmatică a celulei-mamă (fig. 5) în două celule-fiice, de dimensiuni egale, în condiții normale. O înaltă sincronie a diviziunii celulelor filamentului este remarcată, mai ales a celulelor învecinate (fig. 6) ceea ce ne-ar putea sugera existența unor factori difuzibili stimulatori ai diviziunii celulare (fig. 6). Și la unicelulare formarea

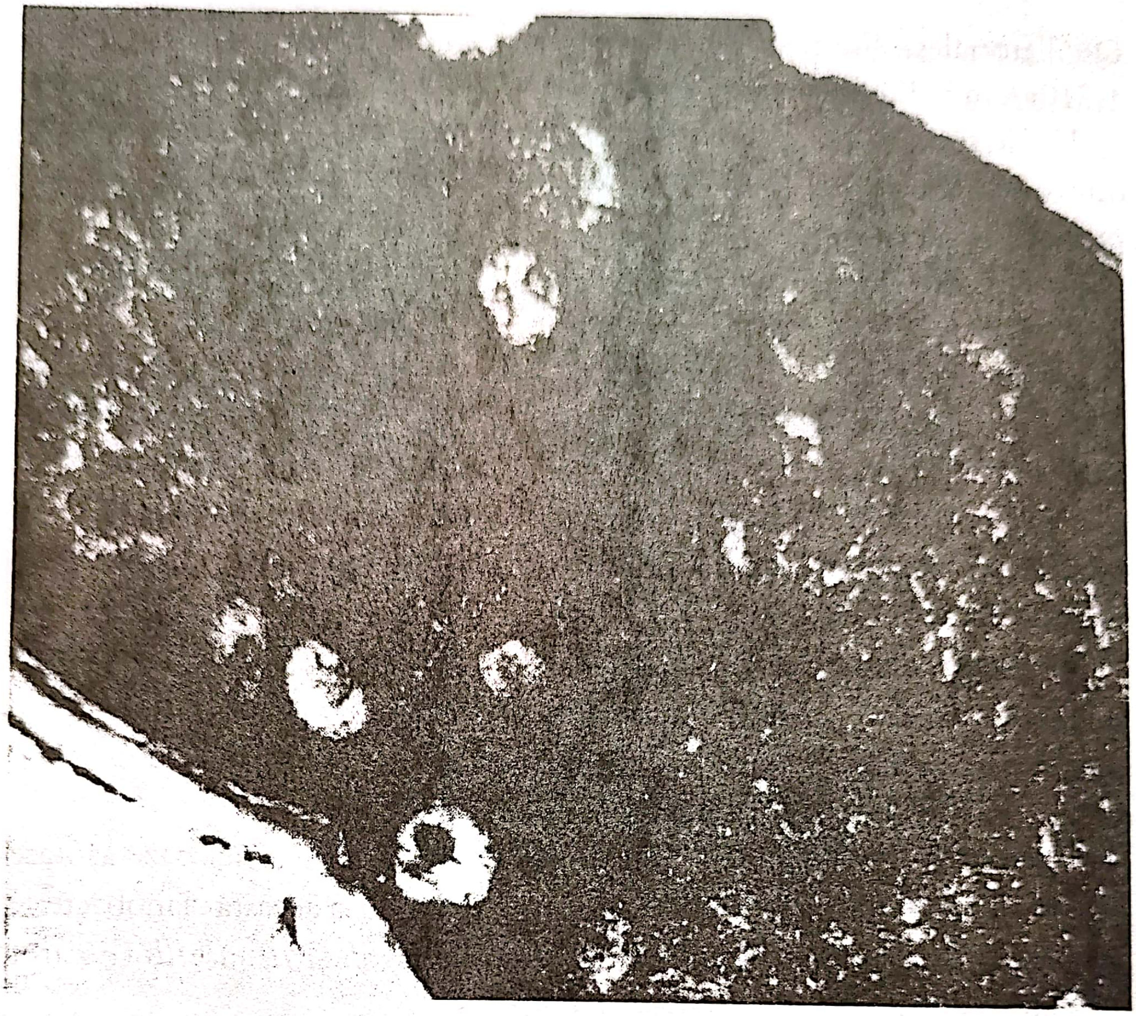


Fig. 5 — Imagine de microscopie electronică a filamentului de *Plectonema boryanum*, cu orientare normală a septului de diviziune. A se remarca separarea nucleoizilor-fii înainte de formarea completă a septumului de diviziune. x60.000 (original).

septumului este un proces strict reglat (fig. 7). În anumite condiții, în medii naturale sau în culturi, apar minicelule cu o repartiție inegală a conținutului celulei-mamă într-o celulă-fiică mare, care uneori moștenește întreaga cantitate dedublată de ADN a celulei-mamă și o celulă-fiică de dimensiuni mici – minicelulă (fig. 8), care, uneori nu moștenește deloc ADN (fig. 9). Asocierea unor structuri neobișnuite, aflate la nivelul nucleoidului, cu procesul de formare de minicelule ne poate sugera faptul că un asemenea proces este unul complex, ce poate fi consecința perturbărilor în segregarea nucleoizilor-fii, induse de infecția celulei cu virusuri ale cianobacteriilor (cianofagi) (fig. 10). Formarea septumului de diviziune care separă cele două

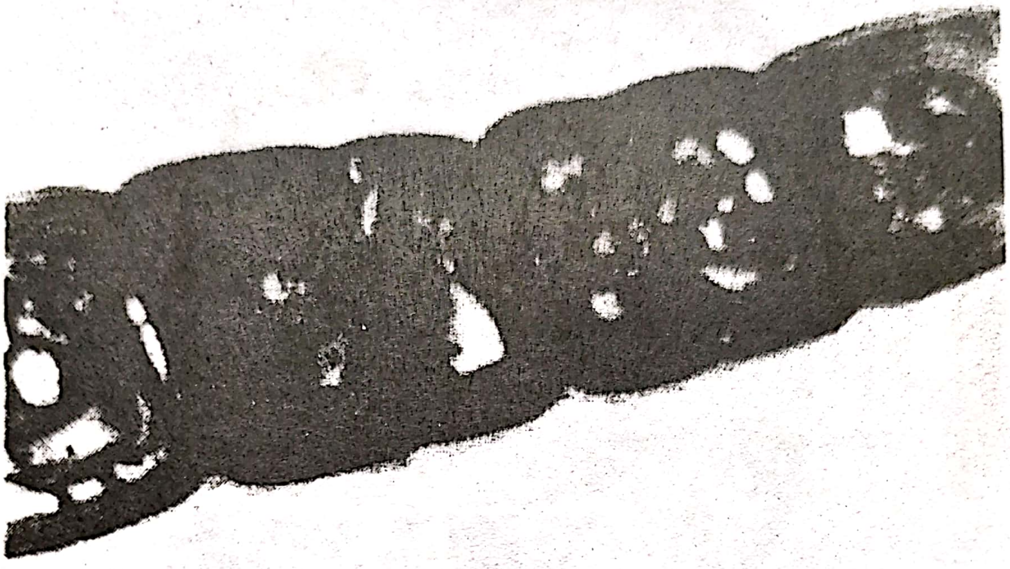


Fig. 6 — Diviziunea celulară la *Plectonema* sp. Se remarcă înalta sincronie a diviziunii în cadrul filamentului x20.000 (original).

celule-fiice, la nivelul invaginării straturilor membranei celulare este un proces complex și strict reglat genetic, în slujba echipartiției informației genetice în celulele fiice. Gradul înalt de sincronizare a diviziunii celulare la nivelul celulelor din filament la Oscillatoriales ca, de altfel și la Nostocales, denotă un nivel rafinat de reglare a diviziunilor celulare și o comunicare intercelulară mediată chimic. Această înaltă sincronie a diviziunilor celulare este evidentă în cazul „înfloririi“ apelor, când în mediu se elimină mari cantități de metaboliți celulari (exocrine) (Gavrilă, 1978). La formele unicelulare se constată același aspect al sincronizării diviziunilor la nivelul populației celulare.

La *Spirulina* și *Synechococcus* s-a descris prezența mezosomilor, prin care cromozomul cianobacterian în replicare și apoi în clivare se atașează la membrana plasmatică, separarea cromozomilor-fii fiind asigurată prin creșterea membranei dintre punctele de atașare a cromozomilor-fii la mezosomi, structuri specializate ale membranei plasmatice. Ritmurile de diviziune ale cianobacteriilor pot fi explozive, mai ales în condițiile germinării

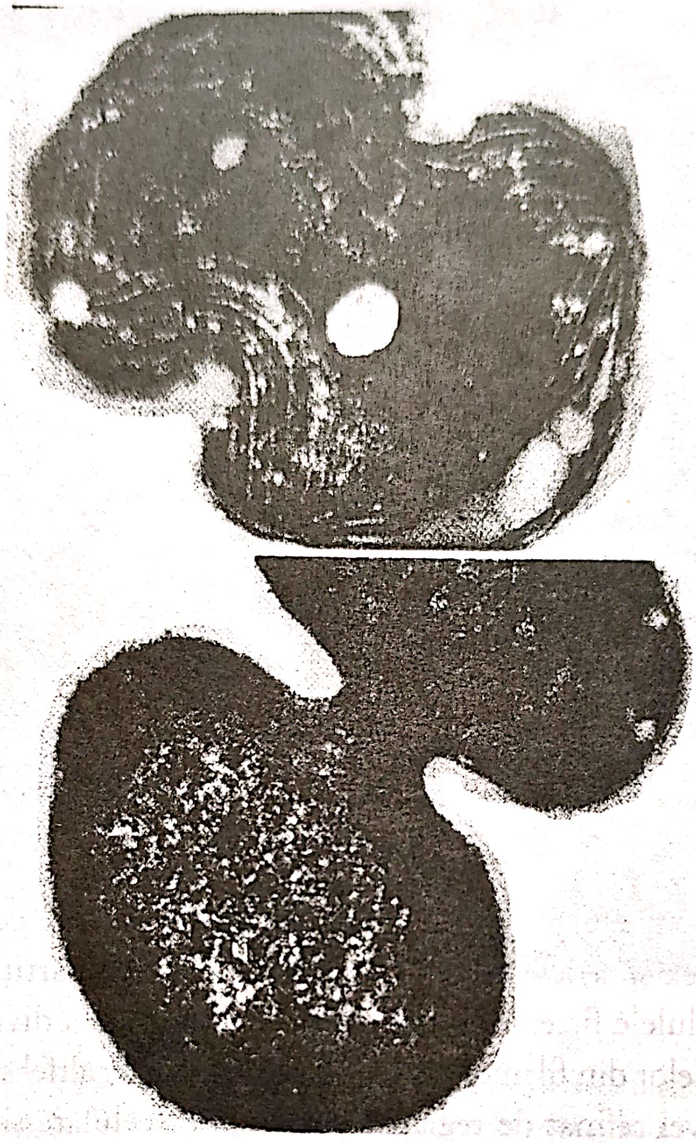


Fig. 7 — Synechocystis PCC 6803: Ultrastructura celulei în diviziune. Se remarcă dispunerea nucleoidului dedublat (reduplicat) de la un capăt la celălalt al celulei ce se divide prin constricție mediană (sus) și repartizarea nucleoizilor-fii în celule-fiice desăvârșită de „gâtuirea“ mediană (jos) (original x57.300).

akineților și diferențierii necrocitelor, ceea ce explică „înflorirea“ apelor cu cianobacterii. Diversitatea strategiilor de formare a septumului de diviziune la cianobacterii este impresionantă, dar toate au un numitor comun și anume precizia, în condiții normale, a morfogenezei acestuia.

La *Chamaesiphon* s-a descris un proces de înmugurire ca mecanism de diviziune celulară (Rippka și colab., 1979).

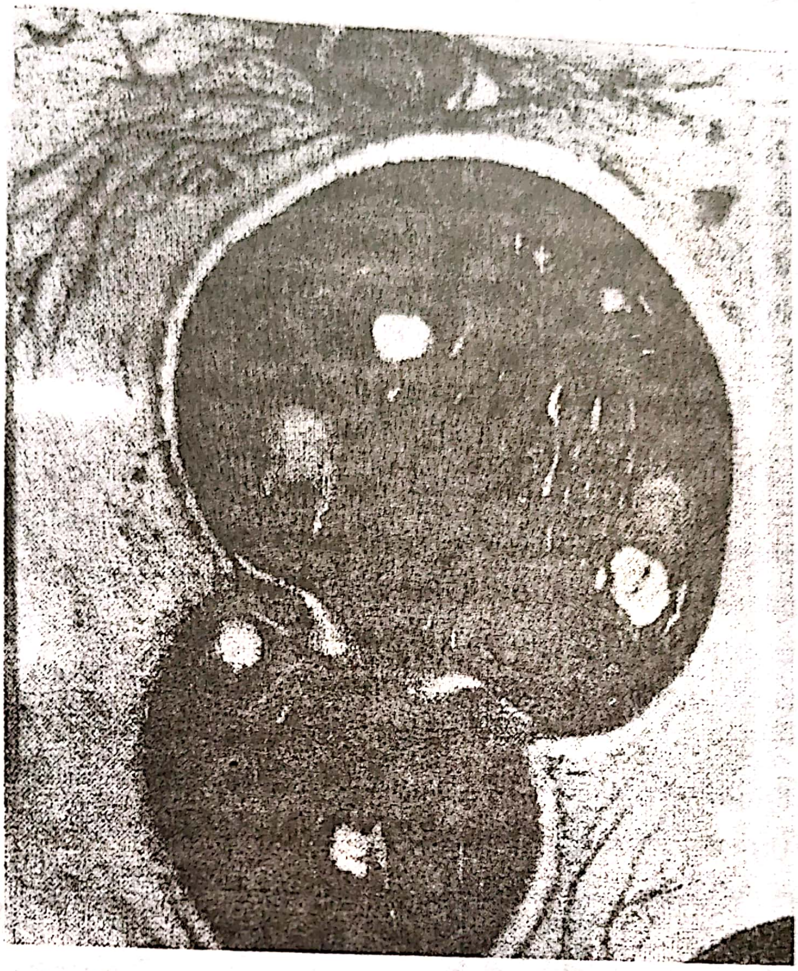


Fig. 8 — *Gloeothecae* sp. la sfârșitul diviziunii prin sciziparitate inegală x9.800 (original).

Așa cum a demonstrat pentru prima dată Fuhs (1963, 1973) cu ajutorul studiilor citochimice, și a fost afirmat și confirmat de microscopia electronică (Hopwood și Glauert, 1960; Ris și Singh, 1961; Pankratz și Bowen, 1963; Leak, 1967), regiunile cu material genetic ale cianobacteriilor sunt comparabile cu cele ale altor procariote, prin faptul că sunt lipsite de membrană nucleară și de cromozomi compacți, de tip eucariot.

Aparenta absență a histonelor (Makino și Tsuzaki, 1971) este firească, dată fiind natura procariotă a cianobacteriilor. Afirmația că fibrilele observate în electronomicrografii ale regiunilor purtătoare de material genetic sunt alcătuite din ADN, a fost confirmată de sensibilitatea lor la DNază (Fuhs, 1963) și de încorporarea de timidină tritiată (^{3}H-timidina) (Leak, 1965). Studiile din ultimul sfert de veac nu au putut evidenția vreo structură neobișnuită a aparatului genetic cianobacterian (Leach și Herdman, 1973).

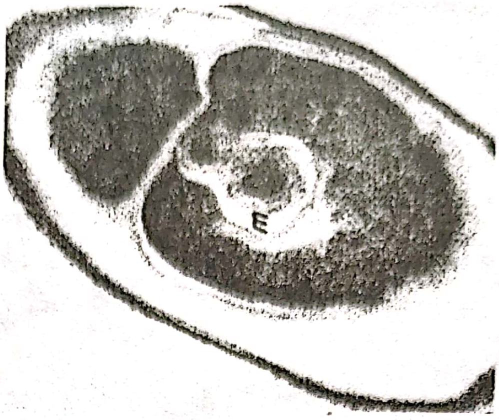


Fig. 9 — Minicelulă și mezosom la *Aphanocapsa* sp. asociat unei celule fiice care a primit tot materialul genetic reduplicat (original).

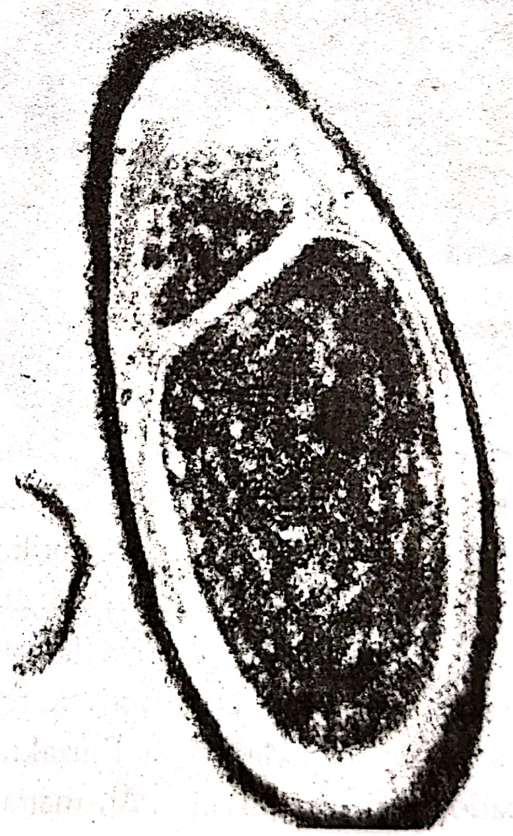


Fig. 10 — Ultrastructura cianobacteriei unicelulare *Aphanothece* sp. Formarea, în condiții naturale de „înflorire a apelor" a minicelulei. Celula fiică mare a primit tot materialul genetic reduplicat. Nucleoidul acesteia este asociat cu o structură scalariformă și o altă structură cristalină,de natură necunoscută, dar care ar putea reprezenta secțiuni prin zone de asamblare a cianofagilor („fabrici" de cianofagi) (original).

Cercetările lui Gavrilă și colab. (1999) au evidențiat existența unei structuri de tip scaffold, asociată nucleoidului cianobacterian. La Synechocystis PCC 6803, Gavrilă și colab. (1999) au evidențiat existența unei rețele tridimensionale asociate nucleoidului, pe care au considerat-o a reprezenta un *scaffold* al nucleoidului cianobacterian (fig. 11).

Natura chimică a unei asemenea structuri nu a putut fi identificată, dar asocierea sa permanentă cu fibrilele ADN este indiscutabilă. În plus, ea este repartizată cu precizie nucleoizilor-fii, în cursul diviziunilor normale ale celulei.

Un aspect care nu a fost dezbătut în literatura de specialitate este legat de diviziunea nucleoidului cianobacterian. Datele noastre privitoare la structura fină a acestui proces ne sugerează că echipartiția nucleoidului dedublat și separarea nucleoizilor-fii precede sau se sincronizează cu procesul de septare, ceea ce înseamnă intervenția unor mecanisme de reglaj genetic deosebit de complexe.

Natura dublu-catenară a ADN cianobacterian este dovedită de prezența celor patru baze nucleotidice normale (Biswas, 1956, 1960) și apariția fenomenului de hipercromicitate, în cursul denaturării ADN cianobacterian (Kaye și colab., 1967; Craig și colab., 1969).

Studiile timpurii privitoare la compoziția în baze azotate a ADN cianobacterian (Edelman și colab., 1967; Stanier și colab., 1971) au fost extinse la analiza a 176 tulpini, reprezentând cel puțin 22 genuri (Herdman și colab., 1979). Variabilitatea generală a compoziției în baze a ADN de 35–71 mol% GC corespunde diversității întâlnite la alte bacterii. Această diversitate este restrânsă la două grupe majore: cianobacterii unicelulare, ce se divid prin fisiune binară (35–71 mol% GC) și cianobacterii filamentoase nonheterocistice (40–67 mol% GC). Toate celelalte tipuri de cianobacterii, incluzând pleurocapsalele heterogene și formele cu heterociști, conțin ADN cu un conținut mai restrâns de GC și anume de 38–47 mol%.

In cadrul cianobacteriilor unicelulare, compoziția în baze a ADN este un criteriu taxonomic util. Pe baza acestui criteriu, s-a putut realiza o subdivizare a genului *Synechococcus* în trei subgrupe (I: G+C% 39–43 și limitele de variație a dimensiunii genomului de 2,6–4,2x10^9 daltoni; II: 47–56 mol% G+C și 1,6–3,1x10^9 daltoni și III: 66–71 mol% G+C și 0–2,6x10^9 daltoni), pe când genul *Synechocystis* a fost subdivizat în două grupe (I: 35–37 mol% G+C și 2,1–2,5x10^9 daltoni și II: 42–48 mol% G+C

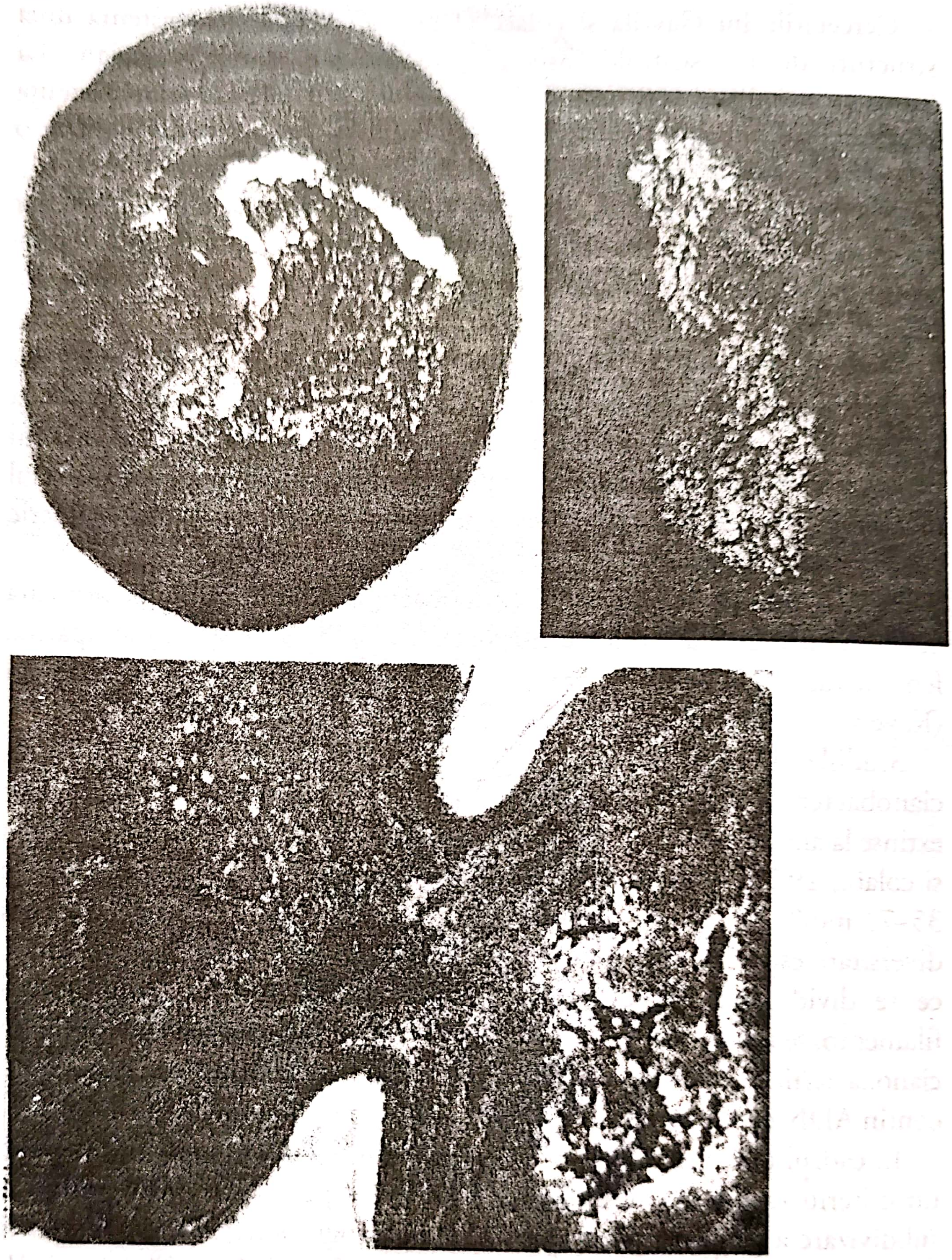


Fig. 11 — Scaffold asociat nucleoidului la *Synechocystis PCC 6803* și diviziunea acestuia cu segmentare în celule fiice (2). În (3), se remarcă diviziunea nucleoidului la *Gleothecae* sp., înainte de diviziunea celulară (original).

și 1,8–3,5x10^9 daltoni). Interesant că o asemenea subdivizare este susținută și de alte trăsături fenotipice ale tulpinilor celor două cianobacterii unicelulare. (Rippka și colab., 1979).

Cianobacteriile în ansamblul lor se deosebesc de toate celelalte bacterii prin faptul că prezintă un spectru larg de **dimensiuni genomice** , respectiv de **complexitate genomică**. Toate celelalte bacterii au genomuri cu dimensiune relativ uniformă, cu greutate moleculară variind de la 1,0x10^9 până la 3,6x10^9 daltoni, (Gillis și colab. 1970; Wallace și Morowitz, 1973), cu excepția grupului de tulpini de *Mycoplasma* , care conțin genomuri mai mici (Bak et al., 1969).

Primele studii cantitative privind complexitatea genetică a cianobcteriilor au relevat dimensiuni genomice similare cu cele de la alte bacterii: 2,27x10^9 daltoni și 2,47x10^9 daltoni greutate moleculară la *Anacystis nidulans* UTEX 625 și *Anabaena cylindrica* CCAP1403/I (Herdman și Carr, 1974) și 2,2x10^9-2,8x10^9 daltoni, pentru *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 (Roberts și colab., 1977).

Ca și la alte bacterii, și în contrast cu organismele eucariote, la cianobacterii. sunt absente secvențele repetitive din ADN.

Studiul a 128 tulpini cianobacteriene a relevat o mult mai mare diversitate în coținutul de informație genetică (1,6x10^9-8,6x10^9 daltoni greutate moleculară) care, în general, (Herdman și colab., 1979) s-a corelat cu complexitatea morfologică și/sau fiziologică a organismelor (Herdman și colab., 1979).

Majoritatea tulpinilor unicelulare conțin genomuri mici (1,6x10^9-2,7x10^9 daltoni). Unele tulpini unicelulare au conținut genomuri mai mari, de până la 5,2x10^9 daltoni, majoritatea fiind capabile de fixarea azotului molecular, în condiții anaerobe, iar cele cu cele mai mari genomuri, precum tulpinile de *Gloeothece*, fiind capabile de fixarea azotului molecular, în condiții aerobe. In general, organismele filamentoase au genomuri mari și tulpinile formatoare de heterociști au prezentat o variație mai mare în dimensiunea genomului (3,2x10^9-8,6x10^9 daltoni) decât oricare alt grup, însoțită de o variație extensivă în complexitatea morfologică și proprietățile fiziologice (Rippka și colab., 1979). Intr-adevăr, unele tulpini de *Calothrix*, alături de o singură tulpină examinată de *Scytonema*, prezintă conținuturi genomice mai mari decât oricare alte procariote și au posedat același conținut genetic informațional ca al unor microorganisme eucariote.

Unele tulpini de cianobacterii conțin ADN care renaturează rapid (Herdman și colab., 1979). Acest ADN poate fi interpretat fie ca ADN cromozomal repetitiv sau ca elemente mici extracromozomale (fagi și plasmide), prezente într-un număr mare de copii. Particule fagiforme au fost observate la două tulpini, iar trei (PCC 6701, 7005 și 7120) au conținut plasmide.

Se admite că genomurile bacteriene au evoluat printr-o serie de duplicații ale unui genom ancestral mic (Wallace și Morowitz, 1973; Zipkas și Riley, 1975; Riley și Anilionis, 1978). Genomurile cianobacteriilor au prezentat o distribuție de frecvență discontinuă, fiind încadrate în patru grupe dimensionale (10^9 daltoni): a) 1,6–2,9; b) 2,9–4,4; c) 4,4–5,8 și d) 6,0–8,6 (Herdman și colab., 1979). Dimensiunile medii ale genomurilor pentru fiecare grup au fost (x10^9 daltoni, x2,21 ± 0,31; x3,56 ± 0,37; x5,00 ± 0,39 și respectiv x7,40 ± 0,95). Ele pot corespunde genomurilor care au evoluat printr-o serie de fuziuni ale unui genom primitiv (de 1,2x10^9 daltoni greutate moleculară) spre a crea cromozomi noi, reprezentând două (2,4x10^9), trei (3,6x10^9), patru (4,8x10^9) și șapte (7,2x10^9) copii ale genomului ancestral. ADN redundant, creat prin fuziune, devine disponibil pentru schimbare mutațională și astfel să creeze informație genetică nouă. Grupele cu dimensiune genomică diferită, alături de diversitatea de caracteristici morfologice și fiziologice, sunt compatibile cu evoluția genomică prin duplicație la cianobacterii. Totuși, este dificil să înțelegem funcția excesului mare de ADN din tulpinile „complexe“, la care caracteristicile noi probabil cer nu mai mult decât 100 funcții genice noi. Comparând acest fenomen cu informația genetică a eucariotelor, Doolittle (1979) punea întrebarea la care încă nu s-a răspuns: „este posibil ca procariotele complexe (“avansate“) să poarte asemenea cantități mari de ADN non-informațional?“

Analiza moleculară a ADN cianobacterian la specia *Plectonema boryanum* a evidențiat prezența unor mici cantități de baze azotate metilate, precum 5–metil citozina și 6–metil amino purina. La *Anacystis nidulans*, raportul A/G/C/T este de 23,3:29,5:24,8:22,3. Raportul A/T=1,04, iar raportul G/C=1,08. Raportul Purine/Pirimidine=1,04.

Compoziția chimică a ADN prezintă specificitate de specie și la cianobacterii.

Edelman și colab. (1971) au determinat compoziția în baze azotate (G+C), la 29 de linii ce aparțin familiilor Nostocaceae, Oscillatoriaceae, Rivulariaceae și Scytonemataceae, precum și la șase tulpini din ordinul Chroococcales. La formele filamentoase, variația compoziției G+C a fost limitată, neavând relevanță taxonomică, limitele extreme fiind de la 39 la 51 mol% G+C, douăzeci de tulpini având o variație și mai limitată a acestui procent și anume între 42 și 48 mol% G+C, iar la șase tulpini aparținând ordinului Chroococcales, valoarea compoziției nucleotidice a ADN este cuprinsă între 35 și 71 mol% G+C.

S-au realizat și unele cercetări comparative între grupele tipologice I-V de cianobacterii și conținutul în G+C%, evidențiindu-se faptul că acestea prezintă diferențe semnificative în conținutul G+C, deși pot aparține unui aceluiași grup fundamental. Aspectul morfologic al liniilor din subdiviziunea IA, cu valori mici ale conținutului G+C, nu diferă de cel al liniilor cu conținut ridicat în G+C, din cadrul aceleiași subdiviziuni. Gradul mare de variabilitate a compoziției nucleotidice a ADN este o dovadă a originii polifiletice a cianobacteriilor din ordinul Chroococcales (Pakhomova, 1974).

La reprezentanții hormogonalelor, în compoziția nucleotidică a ADN apar limite apropiate în conținutul G+C, fiind de 38–51 mol% G+C (Edelman și colab., 1967; Pakhomova și colab., 1968; Robert și colab., 1975), acest grup fiind mai conservator, nefiind supus în cursul evoluției sale vreunei divergențe genetice semnificative. Astfel, *Chloroglea fritschii*, dintre *Chroococcales*, are G+C=42%, pe când, la *Nostocales* acest procent variază între 43 și 44%. La cianobacteria marină *Agmenellum quadruplicatum*, Roberts și colab. (1975) au determinat că G+C=48%, cu o cantitate de $1{,}3 \times 10^9$ daltoni ADN/celulă, ceea ce este o dovadă a stării poliploide a celulei .

La *Plectonema boryanum*, conținutul G+C=48 mol%. Cercetările lui Leach și Herdman (1973) au identificat un conținut G+C de 35–71% la Chroococcales și de 35–51%, la Oscillatoriales.

Variația limitată a conținutului G+C% la Oscillatoriales denotă redusa divergență evolutivă ce a avut loc la acestea. Reprezentanții acestui grup, prezintă o mai mare omologie de secvență din ADN, comparativ cu aceea întâlnită la alte secții de cianobacterii . Descoperirea ficovirusului LPP1 care infectează diferiți reprezentanți ai ordinului Oscillatoriales, precum *Lyngbya, Plectonema* și *Phormidium* (de aici denumirea ficovirusului LPP) denotă similitudini majore în secvența nucleotidică a ADN al acestor cianobacterii.

Herdman și colab.(1979) au analizat compoziția chimică a ADN la 176 de linii de cianobacterii, aparținând la 22 genuri diferite, determinând o medie a conținutului G+C de 53 mol%, ceea ce corespunde diversității genetice, găsit la bacterii, cu limite între 35 și 71 mol%.

Cianobacteriile care se divid prin fisiune binară, au o valoare a conținutului G+C cuprinsă între 35 și 71 mol% G+C. Cianobacteriile filamentoase, fără heterociști au un conținut G+C cuprins între 40 și 67 mol%. Celelalte forme pleurocapselare și heterociste au un conținut G+C de 38–47%. Aceste studii demonstrează că pentru cianobacteriile unicelulare, compoziția în baze azotate a ADN este un criteriu taxonomic util. Aplicând asemenea criterii taxonomice, s-a dedus că genul *Synechococcus* poate fi subdivizat în trei subgrupe, iar *Synechocystis,* în două grupe, fiind în acord cu criteriile fenotipice de subdivizare, în cadrul acestor genuri foarte înrudite. Prezența celor patru baze azotate tipice și hipocromicitatea ADN cianobacterian denotă natura dublu-catenară a acestui ADN (Kaye și colab., 1967; Graig și colab.,1969).

Ratele de denaturare de la *Anacystis nidulans* și *Lyngbya* sp. sunt comparabile cu cele de ADN bacterian, de unde se deduce înrudirea filogenetică a acestor procariote. Există asemănare între dimensiunea cromozomului bacterian și a genoforului cianobacterian, cel puțin la cianobacteriile cu celulă mică. Cantitatea de ADN/celulă poate fi variabilă în cadrul aceleași specii, în funcție de tipul de celulă și etapa ciclului celular la care se face determinarea. Aceasta poate fi mai mare în spori, akineți, în unele stadii de diferențiere a heterociștilor, comparativ cu celulele vegetative.

La *Cylindrospermum* sp, celulele vegetative au o cantitate egală de ADN, pe când celula terminală conține o cantitate mai mare de ADN. Akinetul tânăr conține mai mult ADN decât celulele vegetative, iar heterocistul în curs de diferențiere conține cea mai mare cantitate de ADN. Celulele trichomale, din vârful filamentului de la *Calothrix braunii*, conțin 1/5 până la 2/5 din ADN celulelor vegetative cu creștere activă. În funcție de rata de creștere, apare o variație de ordinul a 7,5 ori a cantității medii de ADN celular. Pe baza analizei cineticii renaturării ADN, Herdman și Carr (1974) au stabilit că greutatea moleculară a genoamelor de *Anacystis nidulans* și *Anabaena cylindrica* este de 2,27x109, respectiv 2,47x109 daltoni. Aceste genomuri sunt similare ca dimensiune celui de *E. coli* care este de ordinul a 2,4x109 daltoni.

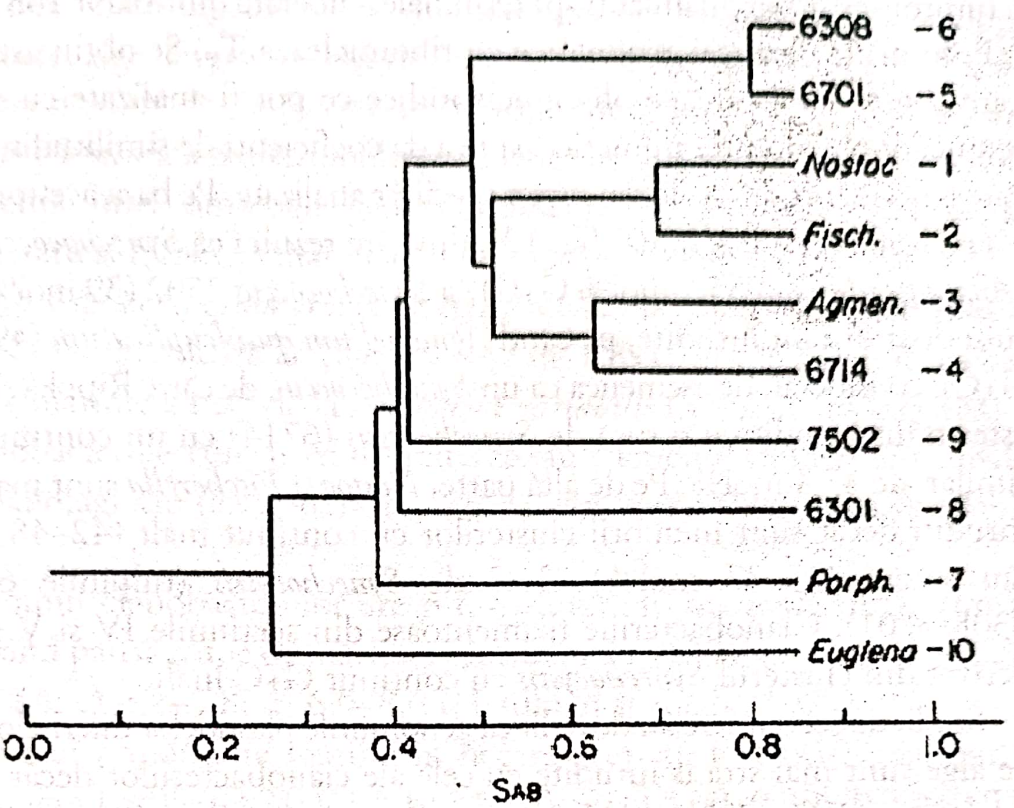


Fig. 12 — Dendrogramă care redă relațiile dintre secvențele ARNr 16S la opt cianobacterii și la plastidele de *Porphiridium cruentum* și *Euglena gracilis.* Sușele 6308, 6701 și 6714 sunt descrise ca specii de *Synechocystis,* de către Rippka și colaboratorii (1979). Sușele 6301, 7502 și *Agmenellum quadruplicatum* sunt considerate de către acești autori a aparține genului *Synechococcus.* Sușa *Nostoc* este descrisă prin simbolul MAC. Sușa *Fischerella* este *F. ambigua* (din Bonen și colab., 1979).

În ADN cianobacteriilor nu au fost identificate secvențe repetate de nucleotide.

Hibridizarea moleculară evidențiază extinsă omologie de secvență între cianobacterii și eubacterii. Mai extinsă este similitudinea de secvență a ADN al unor specii de Oscillatoriales și ADN cloroplastic al algelor verzi, argument pentru originea endosimbiotică, via cianobacterii, a cloroplastelor celulelor eucariote.

Utilizând tehnica caracterizării parțiale a secvenței de nucleotide (catalogarea oligonucleotidică T1), introdusă de către Woese și colab. (1972, 1977) în analiza ARNr 16S, de la opt tulpini cianobacteriene, a fost realizat un arbore filogenetic (fig. 12). Tehnica implică secvențierea enzimatică completă a tuturor resturilor guanilat (Gp) terminale, eliberate din ARNr 16S, marcat ^{32}P, în urma digestiei enzimatice cu ribonucleaza T_1. Se obțin astfel date care constituie cataloage oligonucleotidice ce pot fi analizate cu ajutorul tehnicilor taxonomice numerice, spre a da coeficienți de similitudine (S_{AB}s) care reflectă înrudirea filogenetică a speciilor analizate. Pe baza acestor analize s-a realizat o dendrogramă (fig. 12), din care rezultă că *Synechococcus* 6301 (*Anacystis nidulans* 55,1 mol% G+C), și *Synechococcus* 7502 (39 mol% G+C) sunt doar distant înrudite, pe când *Agmenellum quadruplicatum* (49 mol% G+C), considerat, de asemenea ca un *Synechococcus,* de către Rippka și colab., este strâns înrudit cu o sușă de *Synechocystis* (6714) cu un conținut G+C similar, de 47,4 mol%. Pe de altă parte, *Nostoc* și *Fischerella* sunt mai strâns înrudiți decât sunt membrii clusterilor cu conținut înalt (42–48 mol%) sau scăzut (35–37 mol%) G+C de *Synechocystis* (tulpinile 6714 și 6308/6701). Cianobacteriile filamentoase din secțiunile IV și V par a fi derivat din clusterul *Synechocystis* cu conținut G+C înalt.

Studii de secvențiere au dovedit că genomurile plastidelor diferitelor grupe de alge sunt mai strâns înrudite cu cele ale cianobacteriilor decât cu cele nucleare. ARNr din plastide prezintă omologie de secvență cu ARN cianobacterian și nu cu ARNr citoplasmatic, codificat de gene nucleare la *Euglena.* Cele mai mari valori de hibridizare a ARNr, marcat cu P^{32} și extras din *Gloeocapsa alpicola* au fost obținute cu ADN cloroplastic din *Euglena*, în ceea ce privește ARNr 5S, mai ales.

Cantitatea de ADN per celulă, dată în grame, este mai mare la cianobacterii, decât la bacterii. La *A. nidulans* s-a estimat o valoare de $3,6x10^{-14}$ g ADN/celulă, pe când la *Bacillus subtilis* acesta este de 1,9x $6x10^{-14}$ g ADN/celulă. La *Plectonema boryanum*, utilizându-se ultracentrifugarea în gradient de CsCl s-a evidențiat un maxim de densitate a ADN de 1,707g/cm3, cu o distribuție unimodală, banda sateliferă minoră fiind de natură polizaharidică, probabil glicogen, cu care ADN a fost contaminat (Edelman și colab., 1967). Densitatea în gradient de CsCl, determinată la 29 de specii de Chroococcales, variază de la 1,6949 g/cm3, la *Gloeocapsa alpicola*, la 1,730g/cm3, la *Coccochlosis peniocystis.* Reprezentanții ordinului Oscillatoriales prezintă o variație foarte mică de la 1,704 la 1,710 g/cm3, iar cei ai ordinului Nostocales, o variație mică. Oscillatorialele se caracterizează printr-o mare omogenitate în raportul bazelor azotate, contrastând cu marea diversitate a acestui raport, la majoritatea microorganismelor din alte grupe, bacterii sau eucariote (protozoare, alge, ciuperci). Hibridizarea moleculară între ADN de *Nostoc muscorum* și ADN de *Anabaena variabilis*, pe de o parte, și ADN de *E.coli*, pe de altă parte, arată marea omologie genetică între genurile de cianobacterii și existența unei omologii genetice nesemnificative între speciile de cianobacterii și *E.coli*. O mai mare omologie de secvență apare între ADN cloroplastic de la *Euglena gracilis* și ADN de *Nostoc muscorum*; conținutul de ADN cloroplastic de la *E.gracilis* este de 1,8x10–14 g, fiind de același ordin de mărime cu cel de la *Anabaena variabilis* (3,6 x10–14 g/celulă).

Cianobacteriile conțin ADN reiterat sau elemente extracromozomale mici (cianofagi sau plasmide) care renaturează rapid (Herdman și colab., 1979).

Genomul cianobacteriilor are o distribuție de frecvență discontinuă, prezentând patru grupe de mărime, exprimate în x109 daltoni: a) 1,6–2,9; b) 2,9–4,4; c) 4,4–5,8; d) 6,0–8,6 (Herdman și colab., 1979)

Cele mai importante mărimi în fiecare grup au fost (x109 daltoni ± abaterea standard): a) 2,21±0,31; b) 3,56±0,37; c) 5,00±0,39; d) 7,4±0,95.

Aceste valori corespund la genomuri primitive care au evoluat printr-o serie de fuziuni ale unui genom primitiv, cu o greutate moleculară de 1,2x109 daltoni, pentru a crea cromozomi noi ce conțin: 2(2,4 x10^9); 3(3,6 x10^9); 4(4,8 x10^9); 6(7,2 x10^9) copii ale genomului ancestral.

ADN redundant, creat prin fuziune, poate a constituit baza unor modificări mutaționale prin care au fost create informații genetice noi. Grupele diferite de mărimi ale genomului, împreună cu diversitatea morfologică și fiziologică ce la însoțește, sunt compatibile cu evoluția prin duplicație a genomului cianobacterian.

Mecanismul dublării genomurilor într-o celulă primitivă este necunoscut, deși se sugerează existența unei recombinări omoloage între două genomuri circulare progene, a dimerizării unor genomuri progene.

Studiul a 128 de tulpini de cianobacterii, efectuat de Herdman și colab.(1979) a arătat o diversitate a conținutului informațional genetic de 1,6x10^9 până la 8,6x10^9 daltoni/genom/greutate moleculară, ceea ce se corelează cu complexitatea morfologică și fiziologică a organismelor studiate. Formele unicelulare au genomuri mici de 1,6 x10^9-2,7 x10^9 daltoni, doar puține având genomuri mari. Formele cu heterociști au o și mai mare variație a mărimii genomului de la 3,2 x10^9 la 8,6 x10^9 daltoni, aceasta fiind însoțită și de o variație a complexității morfologice și fiziologice.

Cele mai mari genomuri dintre toate speciile de procariote studiate (bacterii și cianobacterii) au fost evidențiate la cianobacteriile din genurile *Calothrix* și *Scytonema*, având un conținut al informației genetice asemănător microorganismelor eucariote.

Heterocistul de *A. variabilis* conține tot atât ADN și ARN ca și celula vegetativă (Simon, 1980). Akineții conțin mai mult ADN decât celula vegetativă, de 30 de ori mai mult, la *Cylindrospermum*, pe când la *Anabaena cylindrica* conținutul în ADN este egal în akineți și celulele vegetative, aflate în stare exponențială de creștere, reprezentând echivalentul a 57 de copii genomice. Cantitatea de ARN este de 4 ori mai mare în akineți, decât în celula vegetativă, iar conținutul proteinic este de 3 ori mai mare în akinet, față de celula vegetativă.

Conținutul relativ de ADN și ARN din celula vegetativă sau akinet depinde de rata de creștere a organismului, parametru care alterează conținutul în acid nucleic al celulelor vegetative (Mann, Carr și Adams, 1974). În cursul dezvoltării akineților, la *Aphanizomenon flos-aquae* s-a observat o creștere a conținutului în ribozomi și poliribozomi (Wildman și colab.,1975), ceea ce denotă pregătirea unei asemenea celule specializate pentru desfășurarea unor rate intense de sinteze celulare, în vederea desfășurării în scurt timp a unor diviziuni (clivaje celulare) succesive. Fenomenul ne amintește de amplificarea genică ribozomală din politenia insectelor diptere sau din ovocitele amfibienilor urodeli.

Alte aspecte ale structurii și funcției genomului cianobacterian reflectă similitudinea acestor organisme cu bacteriile. Replicarea ADN este controlată și legată de ciclul diviziunii celulare, iar conținutul total de ADN celular variază odată cu rata de creștere (Mann și Carr, 1974; Parrot și Slater, 1980; Herdman și colab., 1982).

ARN polimeraza cianobacteriană este inhibată de aceleași antibiotice care inhibă enzima bacteriană omoloagă (Leach și Herdman, 1973) și polimerazele din *Fremiella diplosiphon* și *Anacystis nidulans* UTEX 625, deși diferă ușor de acelea de la *Escherichia coli* (Miller și Bogorad, 1978), recunosc totuși, promotorii bacteriofagului lambda (Miller și colab., 1979). La *Synechocystis* PCC 6701 s-a descris o proteină de legare la ADN, de tip histonă-like, similară în toate privințele cu proteina HU, de la *Escherichia* *coli* (Haselkorn și Rouviere-Yaniv, 1976; Aitken și Rouviere-Yaniv, 1979). La *Anabaena variabilis* (tulpina Myers) genomul a fost izolat sub forma unui cromozom pliat, descoperindu-se că acesta este circular (Dimitrieva și Kozlov, 1979). Probabilitatea ca replicarea genomului să fie bidirecțională la *Anacystis nidulans* (Delaney și Carr, 1975) confirmă natura tipic bacteriană a aparatului genetic cianobacterian și caracteristica sa de replicon tipic.

CAPITOLUL XII

MUTAGENEZA LA CIANOBACTERII

La cianobacterii s-a întâmpinat o mare rezistență, în obținerea de mutante auxotrofe, de unde s-a tras concluzia că aceste procariote sunt rezistente la mutageni. Dar, s-a dovedit că nitrozoaminele nitrosometilurea (NMU) și N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) sunt mutageni eficienți pentru o tulpină de *Anacystis nidulans*, pe când dietil sulfatul (DES), metilmetansulfonatul (MMS) și etilmetansulfonatul (EMS) ca și razele UV și X, apoi mitomicina C, acridinoranjul și hidroxilamina au fost mai puțin eficiente în inducerea de mutații, la această cianobacterie (Shestakov și Jevner, 1968; Shestakov, 1972). Utilizându-se NTG, iradiere UV, acriflavina, 2–aminopurina și cafeina, s-au indus la *Plectonema boryanum* UTEX 594 mutații de rezistență la fag și mutații de rezistență la streptomicină *(str)*. Cea mai eficientă a fost NTG în inducerea mutațiilor de rezistență la fag, pe când acriflavina a fost cea mai eficientă în inducerea mutațiilor str. Considerându-se formarea mutantelor aro, rezistente la p-fluorofenilalanină, s-a constatat că *Aphanocapsa* 6714 a fost cea mai susceptibilă la UV. NMU, NTG, EMS, euflavină și iradierea gamma cu ^{60}Co au fost relativ ineficiente, deși au determinat o substanțială mortalitate (Astier și colab., 1979). *Gloeocapsa apicola* CCAP 1430/1 a fost, de asemenea, cea mai sensibilă la UV (Lambert și colab., 1980), judecând după frecvența mutantelor **str** induse. În cazul acesta, EMS, mitomicina C, NTG și MMS s-au dovedit a fi ineficiente în inducerea mutațiilor. Dimpotrivă, *Synechococcus* PCC 6301 a fost mult mai ușor mutagenizat de către NTG și EMS, decât de către UV (Herdman și colab., 1980), inducându-se un evantai larg de mutante auxotrofe.

În privința radiației ionizante, s-au obținut doar curbe de supraviețuire, de către Bazin (1969) și Asato (1971), la *A. nidulans* Tx20, și de către Astier și col. (1979), la *Aphanocapsa* 6714, după iradiere cu ^{60}Co. Încă nu se cunoaște cu certitudine dacă radiațiile ionizante sunt agenți mutageni utili în obținerea de mutante la cianobacterii, deși Asato (1971) a izolat o varietate de mutante de pigmentație apărute cu o frecvență de $1x10^{-3}$, în urma iradierii gamma, la *A. nidulans* Tx20.

Cel mai larg utilizat mutagen la cianobacterii este NTG, dar trebuie luate precauții în interpretarea naturii mutantelor izolate, după expunerea la agent alkilant, avându-se în vedere cunoscuta sa capacitate de a induce mutații multiple, la situsuri foarte strâns lincate, la alte organisme, astfel că este de preferat utilizarea unor mutageni mai puțin eficienți (Herdman, 1982).

Examinarea acțiunii mutagenilor la nivel molecular arată că aceștia afectează ADN cianobacterian în același fel în care ei acționează la alte organisme. Razele ultraviolete cu lungimea de undă de 260nm induc formarea dimerilor de timină (Tang și Asato, 1978), pe când EMS (Delaney și Carr, 1975) și NTG (Asato și Folsome, 1970) acționează în mod specific, la nivelul bifurcației de replicare, producând doar un pic tranzient în frecvența mutațiilor unei gene, în momentul în care bifurcația de replicare trece la nivelul acelei gene, în cursul replicării, în culturi sincronizate.

Este important a se face distincția dintre efectele letale directe ale mutagenului asupra celulelor și producerea de compuși toxici în mediul de suspensie, în timpul expunerii. Srivastava și Kumar (1969) au demonstrat că iradierea UV a mediului de cultură a produs compuși care au inhibat creșterea, atunci când după această iradiere doar a mediului acesta a fost inoculat cu celule de *Anabaena doliolum*. De aici, s-a dedus că celulele trebuie iradiate într-un tampon adecvat, așa cum se practică, potrivit standardelor studiilor de genetică bacteriană.

Cele mai multe mutante au fost izolate la *Anacystis nidulans* UTEX 625 și sușe înrudite și ele au fost utilizate ca markeri în studii de transfer genic. Mutante pure de rezistență, clonale, sunt ușor de izolat, având frecvențele de mutație spontană în limitele 10^{-7}–10^{-9}, pe când cele induse mutațional au frecvențele de 10^{-4}–10^{-6} (Ladha și Kumar, 1978).

Tot la *A. nidulans* au fost izolate mutante rezistente la alți compuși și au fost desemnate **fad** și **fur**, prima fiind alterată în gena pentru acetat tiokinază și manifestând rezistență la propionat. Mutantele **aroP** și **aroT** prezintă asemănări cu mutantele pentru permează de la *E. coli*. Au fost identificate și mutantele reglatoare, rezistente la analogi de aminoacizi și excretând triptofan, fenil-alanină, tirozină, metionină sau arginină, la *Anabaena* și la *Synechococcus*. Mutantele de rezistență la compuși pe bază de uree au fost descrise la *Aphanocapsa*. La *Plectonema boryanum* s-a izolat o mutantă rezistentă la etionină și DL-norleucină (Hentschel și colab., 1978), pe când la *Nostoc* sp. s-au descris mutante **can**, deficiente în transportul argininei. La *Nostoc muscorum*, Singh și Singh (1978) au descris mutante **azi** și mutante rezistente la tungsten. Mutante **chl** au fost descrise la *N. calcicola*, iar la *Anabaena ambigua* s-au descris mutante **cml** și **fur**.

Mutantele rezistente la cianofagi apar spontan sau în urma tratamentului cu mutageni, la *Plectonema boryanum*, *Anacystis nidulans* și *Nostoc muscorum*.

Mutante auxotrofice, apărute ca urmare a tratamentului cu NTG și EMS, au fost descrise la *Anacystis nidulans*, *Anabaena variabilis* și *Agmenellum quadruplicatum* de tip Ace-, Bio-, Cys-, Arg-, Leu-, Pab-, Pur- (necesită adenină), Thi- și Pyr- (necesită uracil).

Cele mai multe dintre aceste mutante au necesitat o sursă de azot anorganic și multe au produs heterociști cu morfologie aberantă. Au mai fost descrise și alte mutante auxotrofe la *Anacystis nidulans* și *Nostoc muscorum* desemnate Mdh$^-$, Nir$^-$, Thi$^-$, Pab$^-$, și Glt$^-$. La *Anabaena cycadeae*, *A. doliolum* și *Phormidium mucicola* s-au obținut mutante induse UV și DES care necesită glucoză pentru creștere.

Mutante deficiente în pigmenți și în activitate fotosintetică au fost descrise la *Agmenellum quadruplicatum* și *Anacystis nidulans* care prezintă colonii galbene, fiind deficiente și în asimilarea azotului (Nar$^-$), degradându-și ficocianina (PC), din care cauză trebuie făcută o interpretare atentă, oferindu-li-se o sursă potrivită de azot (de ex. NH$_4^+$ sau glutamina) spre a fi înlăturat blocajul mutațional. Mutantele galbene conțin un nivel redus de PC, pe când mutantele albastre au un conținut crescut de PC și au un conținut descrescut de clorofilă (Chl). Locii genici răspunzători de fenotipul galben manifestat în urma tratamentului cu EMS au fost cartați în trei situsuri distincte, pe când cei pentru fenotipul albastru, în două asemenea situsuri, din cromozomul cianoficean. La *Synechocystis* și *Synechococcus*, conținutul redus de ficobiliproteină (ficoeritrină-PE) și de PC se corelează cu alterări structurale în ficobilisomi și cu absența simultană a polipeptidelor ficobilisomale de 33,5Kd și de 30 Kd. La *Synechococcus cedrorum* s-au descris trei clase de mutante termosensibile și de fluorescență. La *Anacystis nidulans* cultură continuă, în roșu îndepărtat (>650nm), pentru multe generații, a condus la selecția spontană a mutantelor cu compoziție alterată a pigmenților, condiții în care tipul sălbatic a crescut slab. Colonii mutante de diferite culori au putut fi identificate pe agar, unele crescând mult mai rapid în iluminarea infraroșu, decât tipul normal.

Creșterea heterotrofă a speciei *Anabaena variabilis* a permis producerea a cinci mutante deficiente în fotoautotrofie (Shaffer și colab., 1978), cu alterarea fixării CO2 și reducerea activității PSII.

Unele cianobacterii au capacitatea nativă de a suferi adaptări cromatice, dar la Calothrix PCC701 s-au evidențiat mutante defective în acest proces, cu nivele extrem de reduse de ficobiliproteine, în condiții de lumină, dar încă capabile de adaptare cromatică, cu nivele reduse de PE și PC, dar cu superproducție de APC. Mutante asemănătoare au fost descrise la *Pseudanabaena*, sugerând existența unei gene comune de control al adaptării cromatice.

La cianobacterii au fost descrise și mutante care prezintă alterări ale citodiferențierii. Astfel, la cianobacteriile unicelulare au fost descrise mutante filamentoase (**fil**), caracterizate prima dată de Kunisawa și Cohen-Bazire (1970), la *Anacystis nidulans* UTEX 625. O primă clasă a acestor mutante suferă fisiune binară inegală, ceea ce conduce la nașterea de celule de 1–10 ori mai lungi decât lungimea normală. O altă clasă de asemenea mutante este reprezentată de mutante care se divid rar, dând filamente cenocitice de până la 100 de ori mai lungi decât la forma normală, aceste mutante fiind cartate în regiuni diferite ale genomului acestei specii (Delaney și Carr, 1975).

La *Agmenellum quadruplicatum* BG-1 au fost descrise mutante septate și serpentiforme, prezentând dereglări în fazele finale ale formării septumului de diviziune.

La asemenea mutante poate fi restabilită morfologia tipului sălbatic, dacă sunt crescute pe un mediu la care se adaugă o parte a mediului de cultură în care este crescut tipul normal, ceea ce a condus la concluzia că a intervenit un efector difuzibil al diviziunii celulare normale, produs de către tipul sălbatic.

O altă mutantă termosensibilă a produs filamente lungi, în condiții de creștere normală, la 39°C (rezultate din diviziuni celulare nefrecvente în cursul creșterii rapide), pe când limitările nutriționale au cauzat o diviziune rapidă și formarea de celule anormal de mici (Ingram și colab., 1975).

Pentru formele filamentoase, primele mutante au fost descrise la *Plectonema boryanum* UTEX 594. Trichoamele scurte sunt asociate cu pierderea heterociștilor (Het⁻) la *Anabaena* și *Nostoc*. Mutantele Het⁻ cu trichome lungi au fost descrise la *Cylindrospermum* sp. (Singh, 1976).

La *Anabaena doliolum* și *Nostoc linckia* s-au descris mutații induse, având capacitatea de a forma ramificații adevărate (Singh și Tiwari, 1969; Dhar, 1979). Alterări ale morfologiei filamentului s-au descris și la *Anabaena ambigua*. La *Anabaena flos-aquae* și *Anabaenopsis raciborski* apar spontan mutante lipsite de vacuole gazoase, întâlnite cu mare frecvență la cianobacteriile unicelulare *Microcystis aeruginosa* și *Aphanizomenon flos-aquae*. La *Anabaena variabilis*, Singh (1978) a identificat o mutantă cu vacuole gazoase, deși în mod normal, această specie este lipsită de asemenea structuri.

Mutații heterocistice (Het⁻) se prezintă fără diferențiere de heterociști și apar spontan în culturi de cianobacterii care diferențiază în mod normal heterociști, dar care sunt menținute în prezența unei sușe de azot combinat (Rippka și colab., 1979). *Anabaena variabilis* este de fapt o mutantă spontană Het⁻, deoarece, la tulpina Meyer a acestei specii, s-au identificat revertanți Het⁺ (Rippka și Stanier, 1978). Fenotipul Nif⁻ a fost în mod frecvent identificat prin incapacitatea mutantelor de a reduce acetilena sau de a crește pe socoteala azotului atmosferic, în condiții aerobe. Caracterizarea mutantelor Nif⁻ a sugerat că genele **het** și **nif** sunt reglate de către un același determinant genic.

Mutantele de *Anabaena* CA, selecționate ca rezistente la metionină sulfoximină sau 7–azatriptofan, au fost deficiente în mecanismul de protecție față de oxigen a nitrogenazei, din heterociști (Gotto și colab., 1979). Deși relația dintre sensibilitatea la oxigen și rezistența la inhibitori nu este încă cunoscută, o asemenea abordare este clar utilă și poate indica faptul că alături de rolul glicolipidelor peretelui celular al heterocistului, determinat la mutantele sensibile la oxigen, ale speciei de *Anabaena variabilis* UTEX 1444, de către Haury și Wolk, în 1978, trebuie să existe și alte mecanisme de protecție. Asemenea mecanisme trebuie că operează la speciile unicelulare de *Gleothece* care au capacitatea unică de a fixa azotul, în condiții aerobe (Rippka și colab., 1979). Izolarea unei mutante lipsite de teacă, la *Gleothece* PCC 6909, care era încă capabilă de a realiza fixarea aerobică a azotului, demonstrează că teaca nu joacă vreun rol în protecția față de oxigen. Mutantele deficiente în diferențierea akineților apar spontan la *Cylindrospermum majus* (Singh și Sinha, 1965) și *Anabaena doliolum*, după iradiere UV sau tratament cu NTG. Faptul că are loc o pierdere mutațională simultană a capacității de a produce cele două tipuri diferențiate de celule-akineți și heterociști, denotă existența unui component comun în realizarea procesului citodiferențierii celor două tipuri de celule, caracteristice cianobacteriilor. După toate probabilitățile, acest component este reprezentat de membranele polizaharidice, care se prezintă foarte asemănătoare la cele două genuri de cianobacterii. Reapariția simultană a akineților și a heterociștilor la revertanții mutantei Het$^-$ de *Wollea bharadwajae* (Singh, 1976) și structura alterată a anvelopei akinetului, la o mutantă Het$^-$, de *Nostoc* PCC 7524, sprijină ideea existenței unui asemenea component comun (Sutherland și colab., 1980). Dar, diferențele mari dintre akineți și heterociști arată că totuși, genele implicate în geneza lor pot suferi mutații independente. Mutante Het$^+$ și Aki$^-$ au fost identificate la *Anabaena doliolum*, *A. variabilis*, *Nostoc linckia* și *Gloeotrichia ghosei* (Singh și colab., 1971–1979). La rândul lor, mutantele Het$^-$ de *Anabaena doliolum*, *A. variabilis*, *Cylindrospermum* sp. și *Nostoc* PCC 7524, sunt adesea capabile să producă akineți.

Ladha și Kumar (1978) și Asato (1976) au descris mutații în genele implicate în procesele de reparare a leziunilor din ADN, la *Anacystis nidulans*. La *Synechococcus aquatilis*, Zhevner și Shestakov (1976), au descris mutante defective în fotoreactivare. Au mai fost descrise mutante de rezistență la antibiotice sau la alte droguri, precum și mutante de rezistență la analogi de aminoacizii, mutante de rezistență la azida de sodiu și la tungsten. De asemenea, au fost descrise mutante de rezistență la cianofagi, apărute în urma acțiunii NTG, UV, acriflavinei, 2–aminopurinei și a cafeinei. Tot astfel, sunt descrise mutante morfologice, de pigmentație și de diferențiere celulară, etc. Tratamentul cu DES la *Anacystis nidulans* a permis lui Gupta și Kumar (1970) să obțină mutante pleiotrope, care prezentau o bogată filamentație (mutație morfologică), dependentă parțial de streptomicină, în inducția pigmentului și o mai mare rezistență față de iradierea UV. Tot astfel, van Baalen (1973), utilizând tratamentul cu NTG, a obținut la *Anacystis nidulans* tulpini filamentoase, care prezentau blocaje în asimilarea azotului, precum și mutații de pigmentație.

Au fost obținute și descrise numeroase mutante auxotrofe desemnate Nar$^-$, Nir$^-$, Phe$^-$, Trp$^-$, Ace$^-$, Bio$^-$, Cys$^-$, Met$^-$, Arg$^-$, Pyr$^-$, Pab$^-$, Pur$^-$, Thi$^-$, Ser$^-$, Mdh$^-$, Nic$^-$, etc., necesitând diferiți aminoacizi, uracil (Pyr$^-$) sau adenină în cazul Pur$^-$, la *Anacystis nidulans*, *Agmenellum quadruplicatum*, *Synechococcus cedrorum*, etc.

Mutanți ai diferențierii celulare au fost descriși atât la formele unicelulare cât și la cele filamentoase, cele mai multe având afectate componentele moleculare și celulare, legate de diviziunea celulară. De asemenea, au apărut mutante care afectează morfologia, numărul și localizarea heterociștilor, precum și mutante care au afectat akineții.

Studiile de mutageneză au permis identificarea numeroșilor markeri genetici cromozomali ai cianobacteriilor, așa cum rezultă din tabelul 2 (după Smith și Lucas, 1971; Fisher și colab., 1981; Doolittle și Singer, 1974, 1975; Herdman și colab., 1980; Mazur și colab., 1980; Kaney, 1973; Vaillancourt și colab., 1978; Currier și Wolk, 1978; Ingram și colab., 1972).

Tabelul 2. Markeri genici pentru desemnarea mutațiilor la cianobacterii

Simbolul genei	Mnemonic (de unde derivă simbolul)	Fenotipul
ace	acetat	necesitate pentru
aki	akinet	deficiență în formarea sau în structura akineților
amp	ampicilină	rezistență la ampicilină sau penicilină
arg	arginină	necesită
aro	aromatic	rezistență la aminoacizii aromatici sau analogii lor
azi	azidă	rezistență
bio	biotină	necesită
can	canavalină	rezistență
chl	clorat	rezistență
cml	cloramfenicol	rezistență
cys	cisteină	deficiență în reducerea sulfatului
ery	eritromicină	rezistență

Simbolul genei	Mnemonic (de unde derivă simbolul)	Fenotipul
fadD	degradarea acizilor grași	rezistență la propionat (acetat tiokinază)
fil	filamentos	formarea de filamente de către specii unicelulare
het	heterocist	deficiență în formarea, structura și funcția heterociștilor
kan	kanamicină	rezistență
neo	crineomicină	rezistență
nif D	fixarea nitrogenului	mutația genei pentru subunitatea nitrogenazei
nir	nitrit	nitrit reductaza
pab	p-aminobenzoat	necesită
rif	rifampicină	rezistență
thi	tiamină	necesită
trp A	triptofan	proteina A a triptofan-sintetazei

Mutantele **Aki**$^-$ de *Nostoc* PCC 7524 sunt încadrate în mai multe clase fenotipice care încep de la pierderea completă a diferențierii celulare (incapacitatea de a acumula cianoficină, absența peretelui celular gros și a anvelopei pluristratificate), până la mutante deficiente în formarea unuia sau a mai multor straturi ale anvelopei.

La cianobacterii nu au fost încă identificați transpozoni. Genele cianobacteriene pot fi însă etichetate și clonate prin transpoziție, utilizând transpozoni de la bacteria *Escherichia coli*. Astfel, Marsac și colaboratorii (1982) au identificat o genă implicată în biosinteza metioninei, prin transpoziția transpozonului Tn 901, care conține gena de rezistență la ampicilină, în cromozomul de *Synechococcus* PCC 7942 (*Anacystis nidulans* R2). În cadrul acestui experiment a fost introdus transpozomul în cianobacterie, prin transformare cu plasmidul pCH1, care se replică în cianobacterie, purtând transpozonul Tn 901. Toate celulele transformate exprimă rezistență la ampicilină, determinată de gena purtată de transpozon. Walk și colaboratorii (1991) au construit mai mulți transpozoni, plasând **luxAB** întâmplător în cromozom, în diferite locuri.

Experiențele de mutageneză prin recombinare realizează integrarea de ADN străin în cromozom (Golden și colab., 1986). Prin mutageneză ectopică s-au produs mutații în diferite situsuri din cromozomul de *Synechococcus* PCC 7002, prin ligarea de fragmente randomice de ADN cromozomal din celula gazdă la un fragment de ADN ce poartă o genă de rezistență la antibiotic.

O altă cale a mutagenezei inserționale, aplicabilă în liniile transformabile de cianobacterii este inactivarea unei gene cunoscute din cromozomul celulei gazdă prin înlocuirea ei, în urma recombinării omoloage, cu alela întreruptă (fracturată) a acelei gene. Astfel, se realizează mutația țintită a genei de interes și se urmărește efectul unei asemenea mutageneze țintite asupra fenotipului, identificându-se astfel, funcția genei supusă mutagenezei. Pe această cale, s-a dovedit că toate cele trei gene **psbA** ale cianobacteriei *Synechococcus* PCC 7942 sunt funcționale (Golden și colab., 1986).

Pe de altă parte, mutageneza direcționată pe situs, prin care se realizează modificarea unui singur nucleotid dintr-o secvență genică de interes, a fost realizată prin recombinarea de gene clonate cu cromozomul gazdă. Astfel, s-a raportat mutageneza direcționată pe situs a genelor clonate în *E. coli*, prin repararea unei singure catene hibridizate cu un oligomer greșit împerecheat (Kunkel, 1985). Această metodă a fost utilizată pentru modificarea unei gene cianobacteriene clonate, gena mutantă putând fi returnată în celula cianobacteriei, prin transformare mediată de ADN. Asemenea transformare cu ADN genomic ce cuprinde gene specifice pentru centrul de reacție din fotosistemul II, întrerupte prin inserții heteroloage sau modificate prin mutageneză direcționată pe situs, a fost realizată la cianobacteria *Synechocystis* 6803.

CAPITOLUL XIII

PLASMIDE CIANOBACTERIENE

Plasmidele cianobacteriene au fost identificate pentru prima dată de către Asato și Ginoza (1973), la *Anacystis nidulans*. Ulterior, au fost identificate peste 100 de specii sau de tulpini cianobacteriene care s-au dovedit capabile de a găzdui în celula lor asemenea elemente genetice extracromozomale și care aparțin genurilor *Synechococcus*, *Nostoc*, *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Plectonema*, *Anabaena*, *Pseudoanabaena* și *Calothrix*. Dimensiunea acestor plasmide cianobacteriene, endogene, variază de la 2Kb, la peste 100Kb, dar cele mai multe dintre ele au între 2 și 10Kb, fiind proprii pentru a funcționa ca vectori plasmidiali în transferul de gene. Unele cianobacterii au un singur tip de plasmid endogen, altele găzduiesc în aceeași celulă, mai multe tipuri de plasmide.

La *Agmenellum quadruplicatum* au fost descrise șase tipuri diferite de structuri ADN circular covalent închise (ccc) (fig. 13), pe bază de analize electronomicroscopice și electroforetice (Robert și Koths, 1976; Hondelm și colab., 1979; Lan și colab., 1980). Compoziția în baze a ADN plasmidic diferă de a celui cromozomal. Pierderea spontană a plasmidelor 5,3Md, de la *Synechococcus* PCC 6301 și 5,9Md, de la *Agmenellum quadruplicatum* nu are efecte fenotipice (Lan și colab., 1980). Modelele de restrictare a ADN plasmidic sunt similare pentru tulpini de cianobacterii de proveniență geografică foarte diferită. Prezența în plasmidele cianobacteriene de elemente genetice transpozabil, este discutabilă. Plasmidele pDU1, pDU2 și pDU3 de la *Nostoc* PCC7524 au GM cuprinsă între 4,8 și 38 Md. Restricția cu HindIII sugerează că pDU2 este un dimer al lui pDU1 (Reaston și colab., 1980). Kuhlemier și colaboratorii (1981) au reușit să construiască hibrizi plasmidiali desemnați pUC 104 și pUC 105, prin combinarea plasmidului

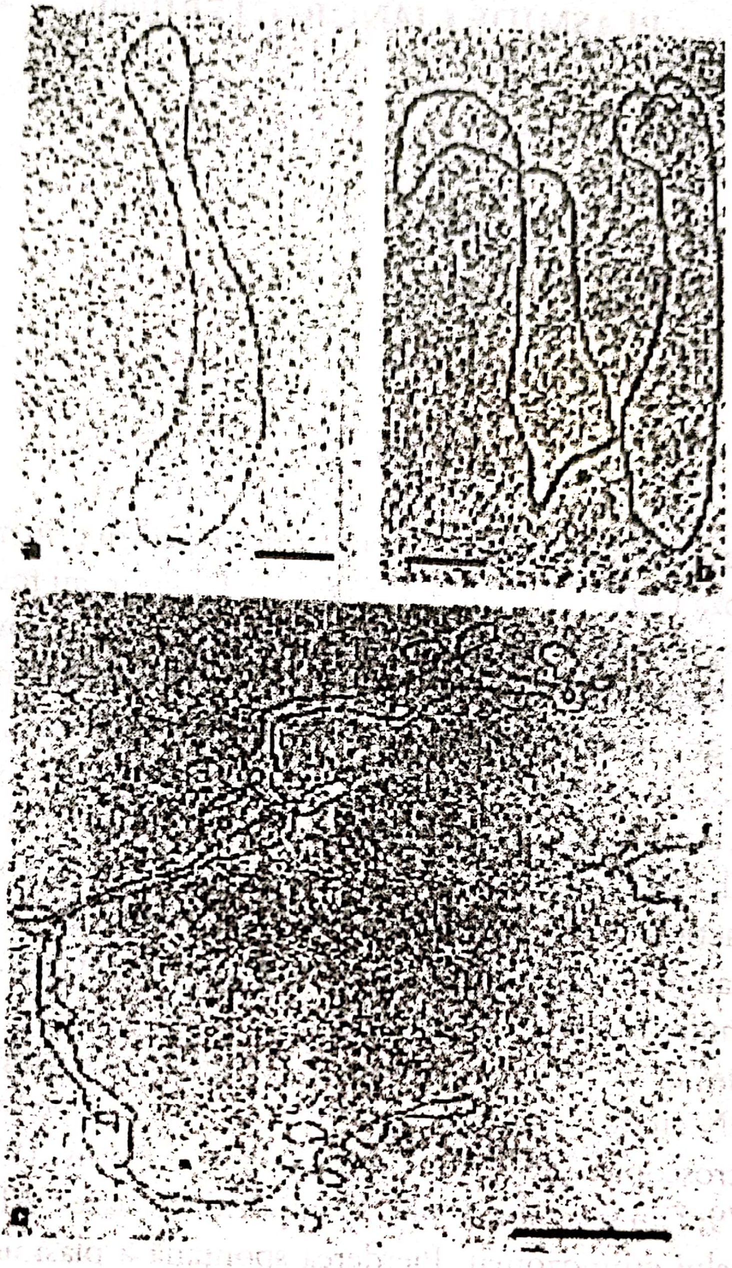


Fig. 1 — Plasmide izolate din *Nostoc PCC 7524*, vizualizate în microscopie electronică.
a. pDU1; b. pDU2; c. pDU3 (în stânga) și pDU1 (dreapta) (după).

pUC 1, de la *Synechococcus* sp. PCC 7542, cu vectorul pACYC 184, de la bacteria *E. coli*.

În cadrul utilizării plasmidelor cianobacteriene ca vectori în transferul de gene, se folosesc markeri de selecție Apr și Cmr pentru rezistență la ampicilină și, respectiv, la cloramfenicol. Au fost realizate plasmide cianobacteriene, precum cele din seriile pAQE, pBAS, pCA, pCB4, pDAH, pDF, pECAN, pFCLV7, pFCI, pFF, pGL, pJCF, pJL, pKB, pLS103, pPBH201, etc., cu utilizare în transfer experimental de gene.

ADN străin a putut fi integrat la țintă prin recombinare omoloagă. Prima încercare în acest sens la cianobacterii este realizată de către Stevens și colaboratorii săi (1980) la *Agmenellum quadruplicatum* PR-6, după care Golden și Sherman (1984) au realizat absorbția și integrarea de ADN străin în *Anacystis nidulans* R2. Tandeau de Marsac și colaboratorii (1982) au construit un vector cosmidic navetă (**shuttle**), desemnat pPUC 29, prin clonarea unui fragment de ADN cromozomal în vectorul plasmidic pACYC 184, de la bacteria *E.coli*. Williams și Szalay (1983) au construit un plasmid hibrid pKW1006 care a fost reconstruit prin vectorul plasmidic pBR322 de *E.coli* și un fragment de 4Kb de ADN cianobacterian, constatând că plasmidul hibrid a fost integrat în ADN cromozomal de *Synechococcus* R2, după transformare, unde rămâne stabil și este replicat. Gena cianobacteriană **rec A**, care codifică enzima de recombinare de ADN omolog, legată de integrarea în ADN cromozomal, a fost clonată și secvențiată (Murphy și colab., 1990). Procedeele ingineriei genetice de transfer transpecific de gene la cianobacterii au devenit mai eficiente, atunci când au fost obținuți sferoplaști de cianobacterii prin tratament cu lizozim. Pe această cale s-a dovedit integrarea stabilă și expresia de exogene în celula cianobacteriană, făcând din cianobacterii un posibil obiect de aplicare a biotehnologiilor moderne, bazate pe tehnologia ADN recombinant, aceste microorganisme fotosintetizatoare oferind multe avantaje față de altele, întrucât pot fi crescute pe medii de cultură simple, au ritmuri explozive de multiplicare și nu prezintă dezavantajul de a fi patogene, fiind și cu rezonanță ecologică.

La *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 a fost realizat primul studiu atent al plasmidelor cianobacteriene de către Roberts și Koths (1976). Ei au observat că ADN circular covalent închis (ccc) are șase dimensiuni diferite. Cercetările lui Roberts și Koths (1976) au fost confirmate ulterior (Hondel și colab., 1979; Lau și colab., 1980). Frecvența diferitelor plasmide a variat cu vârsta culturii: două plasmide sunt cele mai frecvente în celulele aflate în faza post-exponențială, numărul lor scăzând în celulele care cresc exponențial (Roberts și Koths, 1976). Există deci o dependență a numărului de copii plasmidice de vârsta culturii și deci de starea metabolică a celulei.

Cel puțin jumătate dintre cianobacteriile examinate conțin plasmide de diferite tipuri. Limitele de variație a dimensiunii plasmidelor sunt între 1,9 și 75 Md. Compoziția în baze azotate a ADN plasmidial este diferită de aceea a ADN cromozomal (Roberts și Koths, 1976; Lau și Doolittle, 1979).

Pierderea rezistenței la streptomicină, după subcultivarea lui *Anacystis nidulans*, în prezența proflavinei, sugerează, după Kumar și colaboratorii (1976), că aceasta a fost consecința alterării unui plasmid, dar rezistența la medicamente nu s-a dovedit niciodată a fi codificată de plasmide. Intr-adevăr, rezistența scăzută a acestei tulpini la streptomicină nu suportă această interpretare. Nu s-a desemnat încă nici o funcție pentru plasmidele cianobacteriene. Pierderea spontană a plasmidului 5,3 Md, din *Synechococcus* PCC 6301 și a plasmidului 5,9 Md din *Agmenellum quadruplicatum* BG-1 (Lau și Doolittle, 1979; Lau și colab., 1980) nu a determinat nici o modificare fenotipică, organismele lipsite de plasmide nu au prezentat defecte metabolice detectabile, (Simon, 1978). Plasmidele de *Anabaena* 7120 nu poartă genele **nif** (Mazur și colab., 1980). Totuși, plasmidul 5 Md de *Synechococcus* PCC 6301 a fost transmis in vivo (Lau și colab., 1980) și unele fragmente de restricție ale plasmidelor au fost transcrise diferențial, în lumină și în întuneric (Doolittle, 1981).

La plasmidele de dimensiuni identice, izolate din *Synechococcus*, tulpinile PCC 6301, 6309 (vau den Hondel și colab., 1979; Lau și Doolittle, 1979) și 6311 (van den Hondel și van Arkel, 1980) apar caracteristici de înrudire strânsă a acestor plasmide, ceea ce nu este surprinzător, dată fiind înrudirea strânsă a acestor tulpini cianobacteriene (Rippka și colab., 1979). Totuși, aceleași pattern-uri de restricție au fost observate în plasmidele de *Synechococcus* PCC 6707, o tulpină care diferă de altele prin conținutul de 13 mol% GC (Hondel și colab., 1979; Herdman și colab., 1979) și pot de fapt să aparțină unui alt gen. Apariția de plasmide identice în genuri atât de distincte poate fi un indiciu al naturii lor transferabile, intergenic. In plus, originea diversă a tulpinii 6301 și 6707 (Texas și California) indică apariția pe o arie geografică extinsă a acestor plasmide.

Experiențele de hibridare cu plasmide din tulpini similare precum *Agmenellum quadruplicatum* BG-1 și PR-1, împreună cu tulpina înrudită *Coccochloris elabens*, au arătat omologie plasmidică incompletă, chiar și între cele de dimensiune similară (Lau și colab., 1980). Surprinzător însă, au apărut grade semnificative de omologie interplasmidică, chiar și între plasmide de diferite clase dimensionale. Asemenea regiuni de omologie nu au fost restrânse la fragmente de digestie cu enzime de restricție singulare, ceea ce sugerează că ele pot fi analoage elementelor transpozabile, purtate de multe plasmide bacteriene (Lau și colab., 1980). Deoarece asemenea tulpini au fost izolate în Puerto Rico, New York și Connecticut (Rippka și colab., 1979) înseamnă că aceste elemente sunt extrem de răspândite în natură.

La *Nostoc* PCC 7524 s-au descris trei plasmide pDU$_1$, pDU$_2$ și pDU$_3$, având greutăți moleculare între 4,8 și 28 Md. Digestia plasmidelor pDU$_1$ și pDU$_2$ cu endonucleaza de restricție Hind II relevă pattern-uri identice de restricție. Astfel, pDU$_2$ apare a fi un dimer al lui pDU$_1$ și acesta a fost primul exemplu de plasmid dimeric descris la cianobacterii (Reaston și colab., 1980).

Plasmidele cianobacteriene au fost identificate pentru prima dată de Asato și Ginoza (1973), la *Anacystis nidulans.* Ulterior, au fost identificate peste 100 de specii sau de tulpini cianobacteriene care s-au dovedit capabile de a găzdui în celula lor asemenea elemente genetice extracromozomale și care aparțin genurilor *Synechococcus*, *Nostoc*, *Synechocystis*, *Oscillatoria*, *Phormidium*, *Plectonema*, *Anabaena*, *Pseudoanabaena* și *Calothrix*. Dimensiunea acestor plasmide cianobacteriene endogene variază de la 2 kb la peste 100 kb, dar cele mai multe dintre ele au între 2 și 10 kb, fiind proprii pentru a funcționa ca vectori plasmidici în transferul de gene. Unele cianobacterii au un singur tip de plasmid endogen, altele găzduiesc în aceeași celulă, mai multe tipuri de plasmide. Kuhlemier și colaboratorii (1981) au reușit să construiască hibrizi plasmidici desemnați pUC 104 și pUC 105, prin combinarea plasmidului pUC1, de la *Synechococcus* sp PCC 7542, cu vectorul pACYC184, de la bacteria *E.coli*.

Toate plasmidele cianobactriene sunt criptice fenotipic, necunoscându-se rolul lor în fiziologia, ecologia și evoluția acestui grup de microorganisme. Asemenea structuri genetice au fost identificate la specii unicelulare și filamentoase, iar acolo unde nu au putut fi identificate nu este exclus ca ele să existe, dar limitarea metodelor actuale de izolare și purificare a moleculelor mici de acizi nucleici poate reprezenta cauza unui asemenea eșec.

La *Lyngbia versicolor*, *Anabaena variabilis* și *Nostoc spongiaeforme* a fost identificat câte un plasmid, la *Anacystis nidulans* și *Plectonema notatum* au fost identificate câte 2 plasmide, iar la *Phormidium foveolarum* au fost identificate 3 plasmide.

In anul 1976, Murray a descoperit două endonucleaze de restricție, **AvaI** și **AvaII**, la *Anabaena variabilis,* pentru ca ulterior, să se identifice peste 100 de asemenea restrictaze, la *Gloeothece* sp, *Synechococcus* sp., *Synechocystis* sp., *Microcoleus* sp., *Anabaena* sp., *Calothrix* sp., *Cylindrospermum* sp., *Nostoc* sp., *Fischerella* sp.

Cianobacteriile constituie surse bogate de endonucleaze de restricție, unele prezentând caracteristici unice și fiind legate de mecanismul de modificație-restricție față de infecțiile cu cianofagi (Currier și Wolk, 1979; Duyvesteyn și colab., 1983). Aceste enzime interferă și cu transferul de material genetic, explicându-se astfel dificultățile realizării unor sisteme certe de transfer de gene la cianobacterii. Astfel, la *Anabaena,* conjugarea poate să se realizeze numai dacă ADN plasmidic bifazic este modificat, fie prin eliminarea, fie prin metilarea unor secvențe specifice.

Endonucleazele de restricție de tip izoschizomeric, adică restrictaze care recunosc aceeași secvență de nucleotide, au fost identificate chiar și la tulpini neînrudite de cianobacterii. De exemplu, *Aqu I* și *Ava I* recunosc și clivează secvența C↓PyCGPuG (Py=oricare pirimidină; Pu=oricare purină) și sunt produse, prima, de o cianobacterie unicelulară, cea de a doua, de o cianobacterie filamentoasă.

Eficiența acestor restrictaze ***in vivo*** a fost evidențiată de către Currier și Wolki (1979) care au constatat că după propagarea în *Anabaena* 7120 a cianofagului N-I au apărut plaje cu eficiență scăzută pe *Anabaena variabilis* UTEX 1444, pentru ca ulterior, descendeții cianofagilor să manifeste o eficiență crescută a lizei celulelor gazdă. Aceasta poate fi interpretată în sensul că o mică fracție din populația de cianofagi scapă acțiunii sistemului de restricție-modificație din noua gazdă, devenind rezistenți prin metilarea ADN-ului lor în noul model de modificație. Prezența bazelor metilate în ADN cianobacterian reflectă probabil prezența sistemelor de restricție-modificație. Alte enzime de restricție la cianobacterii sunt redate în tabelul de mai jos.

Specificitatea de secvență a endonucleazelor de restricție de origine cianobacteriană este redată în tabelul 1.

Tabelul 1. Enzimele de restricție ale unor cianobacterii (după Priya Sethu și colab., 1996)

Specia de cianobacterii	Enzima de Restricție	Secvența țintă	Autorul
Secțiunea I *Agmenellum quadruplicatum*	AquI (AvaI)	C↓PYCGPuG	Lau și Doolittle (1980)
Secțiunea III *Microcoleus sp.*	MstI	TGCGCA	Gingeras și colab. (1978)
Secțiunea IV *Anabaena cylindrica*	AcyI	GPu↓CGPyC	de Waard și colab(1978)
Anabaena oscillarioides	AosI (MstI) AosII (AcyI)	TGC↓GCA GPu↓CGPyC	de Waard și colab. (1979)
Anabaena subcylindrica	AsuI AsuI (MstI) AsuIII (AcyI)	G↓GNCC TT↓CGAA GPu↓CGPyC	Hughes și colab.(1980) de Waard și Duyvesteyn (1980)
Anabaena variabilis	AvaI AvaII AvaIII	C↓PyCGPuG G↓G($_{T}^{A}$)CC ATGCAT	Murray și colab.(1976) Hughes și Murray(1980) Sutcliffe și Church(1978) Roizes și colab. (1979)
Anabaena variabilis	AvrI (AvaI) AvrII	C↓PyCGPuG CCTAGG	de Waard și Duyvesteyn (1980)
Anabaena sp.	Ast W I (AcyI)	GPu↓CGPyC	de Waard și Duyvesteyn (1980)
Secțiunea V *Mastigocladus laminosus*	MlaI	TT↓CGAA	Duyvesteyn și de Waard (1980).

În paranteză sunt trecute endonucleazele de restricție de tip izoschizomeric, respectiv prima enzimă izolată (prototip).

La cianobacterii apar enzime de restricție de tip izoschizomeri, adică enzime care recunosc aceeași secvență nucleotidică și acești izoschizomeri sunt întâlniți chiar și la tulpini neînrudite. De exemplu, **AquI** și **AvaI** recunosc și clivează secvența C↓PyCGPuG și sunt produse, prima de o algă unicelulară, pe când cea de a doua de o algă filamentoasă.

După propagarea în *Anabaena* 7120 a cianofagului N-1 s-au produs inițial plaje de liză cu o eficiență scăzută pe *Anabaena variabilis* UTEX 1444, dar acești descendenți cianofagici au prezentat ulterior o eficiență crescută a lizei celulelor gazdă. Aceste rezultate sunt interpretate în sensul că o mică fracțiune din populația fagică a scăpat acțiunii enzimelor de restricție în noua gazdă, după care au devenit rezistente în urma metilării în noul pattern de modificație. Doolittle (1979) a scos în evidență prezența bazelor metilate din ADN cianobacterian, ceea ce probabil reflectă prezența la acestea a sistemelor de restricție-modificație.

CAPITOLUL XIV

REPARAREA LEZIUNILOR INDUSE ÎN ADN ȘI FENOMENELE DE PROTECȚIE

La bacterii s-au evidențiat mai multe mecanisme pentru repararea leziunilor premutaționale din ADN (Hayes, 1968; Witkin, 1969; Bridges, 1972). Dintre acestea, unele au fost demonstrate și la cianobacterii.

1. FOTOREACTIVAREA

Acest proces de reparare s-a evidențiat la cianofagul LPP-1 iradiat UV și s-a produs numai la lumină albă și albastră (360–500nm), pe când ADN cromozomal al gazdei, care este *Plectonema boryanum* UTEX 594, a fost reparat suplimentar, la lumină roșie (>540) sau neagră (300–400nm) (Wu și colab., 1967). Aceste diferențe nu pot fi explicate. De remarcat faptul că ADN fagic a fost separat in vitro cu ajutorul extractelor celulare, în lumină neagră. Singh (1975) a observat, pe de altă parte, fotoreactivarea atât a ADN de LPP-1, cât și a ADN cromozomal gazdă, în aceeași tulpină, la lumină neagră (355nm), albastră (380–480nm) și albă, dar nu și în lumină roșie (620–700nm), albastră (480–560nm) sau galbenă. *Fischerella muscicola* s-a comportat similar, pe când *Cylindrospermum* a prezentat fotoreactivare la toate lungimile de undă menționate mai sus. Cercetările lui Singh (1975), cu *Plectonema boryanum* UTEX 594 și fagul LPP-1, ale lui Buckley și Houghton (1976), cu *Gloeocapsa apicola* CCAP 1430/l, și ale lui Amela (1979), cu *Anacystis nidulans* UTEX 625 și fagul AS-1, au demonstrat că lumina cu lungimea de undă apropiată de UV este ea însăși letală la doze mari, ceea ce explică discrepanța în efectele luminii negre.

Și la *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 a fost demonstrată existența fotorectivării (Van Baalen, 1968).

Spectrul de acțiune în acest caz a arătat un pic la 425–450nm, nici o activitate la 500–700nm și foarte mică activitate în regiunea negrului (300–400nm) (Van Baalen și O'Donnell, 1972). Au fost studiate și alte organisme precum *Anacystis nidulans* UTEX 625 (Asato și Folsome, 1969; Asato, 1972; Amla, 1979) și cianofagul AS-1 (Asato, 1976; Amla, 1979); *Synechocystis aquatilis* 428 (Zhevner și Shestakov, 1972); *Aphanocapsa* 6714 (Astier și colab., 1979); *Gloeocapsa apicola* CCAP 1430/1 (Buckley și Houghton, 1975; Williams și colab., 1979), *Anabaena doliolum* (Srivastava și colab., 1971), *Anabaena variabilis* (Singh, 1978) și *Nostoc* PCC 7524 (Herdman, 1982).

Acțiunea unei enzime fotoreactivatoare în extractele de *Plectonema boryanum* UTEX 594 a fost demonstrata într-o analiză a transformării lui *Haemophilus* (Werbin și Rupert, 1968) și enzima a fost purificată din *A. nidulans* UTEX 625 (Saito și Werbin, 1970; Minato și Werbin, 1972).

Enzima purificată a avut un spectru de acțiune asemănător celui de *A. quadruplicatum* , măsurat in vivo, cu un pic evident la 436nm și nici o activitate peste 500nm , clivând dimerii pirimidinici, atât in vitro (Saito și Werbin, 1970), cât și in vivo (Tang și Asato, 1978).

Un sistem de fotoreactivare operațional în lumina albă , dar nu și în cea roșie (>560nm), este capabil să repare leziunile induse de iradierea gamma, la *A. nidulans* UTEX 625 (Asato, 1971).

2. REPARAREA LA ÎNTUNERIC

Sunt date care atestă că repararea la întuneric apare și la cianobacterii. Sensibilitatea la UV a crescut (în condițiile în care fotoreactivarea nu a fost operantă), după tratamentul cu cafeină, la *Anabaena doliolum* (Srivastava, 1970; Srivastava și colab., 1971), *Anacystis nidulans* UTEX 625 (Asato, 1972), *Plectonema boryanum* UTEX 594 (Singh și Kashyap, 1977), dar nu și la *Aphanocapsa* 6714 (Astier și colab., 1979), și după tratamentul cu acriflavină al lui *Anacystis nidulans* (Singh, 1968), *Fischerella muscicola* (Singh și Singh, 1972) și *Anabaena variabilis* (Singh, 1978). Cafeina și acriflavina blochează repararea prin excizie a leziunilor induse de UV, la alte bacterii

(Setlov, 1964; Clarke, 1967) și s-a admis (deși nu a fost demonstrat) că ele acționează în mod similar și la cianobacterii.

Extractele acelulare de *Anacystis nidulans* 602 au conținut enzime, specifice pentru ADN dublu-catenar, care au reparat ADN transformant, inactivat UV și X, al bacteriofagului T4, in vitro. Leziunile induse de iradierea X au fost reparate cu ajutorul unei polinucleotid ligaze dependente de NAD; leziunile induse de UV au fost reparate de o ADN polimerază (indicată de dependența de Mg^{2+}, NAD și de prezențe celor patru deoxiribonucleotide trifosfat) și ligază (Shestakov și colab., 1975).

Iradierea gamma a produs rupturi monocatenare în ADN de *Anacystis nidulans* UTEX 625 (Dimitriev și Grodzinsky, 1975) care, ulterior, au fost reparate. Agenții radiosensibilizatori, precum acidul iodoacetic și p-cloromercuribenzoatul, au determinat creșterea numărului de rupturi, în cursul iradierii și au blocat repararea lor.

Leziunile induse de NTG în *Agmenellum quadruplicatum* PR-6 au fost reparate în cursul incubației celulelor la lumină slabă (Stevens și Van Balen, 1969), sugerând prezența unui sistem de reparare la întuneric pentru acest tip de leziune, presupus a fi diferit, dar acest tip de reparare nu a fost evidențiat și la *Plectonema boryanu*m UTEX 594 (Singh și Kashyap, 1977). Sensibilitatea crescută la efectele mutagene ale EMS a fost observată după incubarea celulelor mutagenizate de *Anacystis nidulans* UTEX 625, în cafeină, deși efectul letal a fost neschimbat (Delaney și Carr, 1975). Deoarece fotoreactivarea nu a reparat leziunile induse de EMS, sistemul reparator trebuie că a fost unul de tipul celor desfășurate la întuneric care, spre deosebire de cel ce operează în repararea leziunilor induse de UV, a reparat leziunile induse, dar acest sistem a fost predispus la erori.

La *A. nidulans* s-a obținut o mutantă în urma iradierii UV care era insensibilă la efectul postiradiere al acriflavinei (Singh, 1968), ceea ce s-a presupus că prezintă deficiențe în sistemul de reparare la întuneric, de tip excizie. Mutantele sensibile la UV de *Synechocystis aquatilis* 428 au fost în același timp sensibile la agenții alkilanți și la raze X (Zhevner și Shestakov, 1972), comportându-se prin aceasta precum mutantele **hcr** de *Escherichia coli* care sunt defective în mecanismul de reparare prin excizie. O altă mutantă, manifestând o sensibilitate crescută la efectul letal al iradierii X, dar mutabilitate redusă, se aseamănă cu mutantele **exr** de *E. coli* care nu prezintă sistemul de reparare postreplicare. Mutantele defective în fotoreactivare au fost izolate și de la *Synechococcus aquatilis* 428 (Zhevner și Shestakov, 1972) și *Anacystis nidulans* UTEX 625 (Asato, 1972, 1976).

O mutantă de *Gloeocapsa apicola* CCAP 1430/1, rezistentă la UV, a prezentat un conținut crescut în carotenoizi, comparativ cu tipul sălbatic (Buckley și Houghton, 1976). În cursul iradierii UV (310–380 nm), nivelul carotenoizilor la tipul sălbatic a scăzut rapid, pe când cel al mutantei a rămas neschimbat. Tulpina rezistentă a devenit sensibilă la UV, după ce a crescut în condiții în care conținutul de caroten a scăzut. Deși conținutul de clorofilă s-a redus în mod similar, s-a tras concluzia că, totuși, carotenoizii îndeplinesc o funcție protectoare, față de efectele iradierii UV.

CAPITOLUL XV

TRANSFER DE GENE LA CIANOBACTERII PRIN TRANSFORMARE, CONJUGARE ȘI TRANSDUCȚIE

Prima dovadă concludentă a transferului genic la cianobacterii a fost adusă de către Bazin (1968): amestecul mutantelor **pmr** și **str** de *Anacystis nidulans* UTEX 625 a generat un fenotip dublu-rezistent. La *Nostoc muscorum* s-a evidențiat transferul genei **nif**$^+$, de la tipul sălbatic, într-o tulpină receptoare aparținând aceleiași specii și care era **nif str**. Genotipul recombinant **nif**$^+$ **str** a apărut cu o frecvență de 400 de ori mai mare decât rata mutației spontane. Cu această ocazie, s-a evidențiat lincajul strâns dintre genele **het** și **nif** sau existența unui reglator comun pentru aceste două gene, de vreme ce ambele caractere au fost transferate totdeauna simultan. Dar, în ciuda unor cercetări care susțin un asemenea lincaj **het-nif**, sunt necesare experiențe suplimentare pentru identificarea neambiguă a mutantelor **nif**$^-$, iar lincajul dintre acești doi operoni pare a fi mai puțin probabil dacă se ia în considerație faptul că genele **nif** sunt dispersate în genomul de *Anabaena* PCC 120 (Mazur și colab., 1980).

Toate experimentele de transformare mediate de plasmide au fost realizate la cianobacteriile unicelulare, natural transformabile, din genurile *Synechococcus* și *Synechocystis*. La formele filamentoase există alternativa utilizării procesului de conjugare pentru transfer de gene. ADN de la bacteria *Escherichia coli* este introdus în cianobacterii, utilizându-se aparatul de conjugare cu spectru larg de gazde, al plasmidelor de tip **Inc P**, așa cum este **RP 4** (Thomas și Smith, 1987), izolat inițial din *Pseudomonas* (Wolk și colab., 1984). Asemenea posibilitate de transfer de gene de la *E. coli* la cianobacterii a fost testată la cianobacteriile filamentoase *Nostoc* și *Fischerella* UTEX 1829 (Flores și Wolk, 1985), dar și la unele cianobacterii unicelulare (Porter, 1986). Plasmide hibride, purtătoare de gene pentru luciferază bacteriană **lux A** și **lux B**, având promotorul genelor structurale pentru ribulozobifosfat-carboxilază sau pentru nitrogenază inserat în amonte de genele pentru luciferază au fost utilizate în experimente de conjugare cu *Anabaena*, dovedindu-se exprimarea genei luciferazei bacteriene în cianobacterie (Schmetterer și colab., 1986). Prin conjugare, se pot introduce fragmente mari de ADN, neavând loc tăierea randomică a ADN introdus, așa cum are loc în transformare, conjugarea fiind astfel mai eficientă în transferul segmentelor neomoloage de ADN. Prin conjugare se realizează cu o mai mare probabilitate produși recombinanți unici (merodiploizi), decât produși dublu-recombinanți (înlocuire de gene), evitând totodată atacul endonucleazelor extracelulare.

Singh și Singh (1972) au sugerat transferul mediat de cianofagi al rezistenței la streptomicină, de la o mutantă de *Plectonema boryanum*, la tipul sălbatic al acestei cianobacterii. Fenomenul de transducție nu a mai fost raportat la nici o altă cianobacterie, deși există numeroși cianofagi virulenți și temperați.

Cianofagii sunt desemnați cu simbolul **BGAV** (de la *Blue-Green Algae Virusus* = virusurile algelor albastre verzi). La reprezentanții genurilor *Lyngbya*, *Plectonema* și *Phormidium* s-a descris virusul LPP1, care prezintă asemănări cu fagii T3 și T7 ai bacteriei *E. coli*, având o capsidă hexagonală, cu dimensiunea 50–60nm. Acest cianofag are ADN bicatenar și un conținut G+C de 5%. Brown și colaboratorii (1966) și Thomas și colaboratorii (1972) au descris infecția cu cianofagi cu apariția de filamente fine de ADN viral la nivelul nucleoidului celulei gazdă, de unde trec apoi la nivelul tilacoidelor, unde apar ca niște elice alungite, pentru ca ulterior să se depună de-a lungul perimetrului celular, alcătuind stroma virogenică în care are loc asamblarea particulelor cianofagice progene. Un al doilea grup serologic de cianofagi a fost desemnat LPP2, având un conținut G+C de numai 2%. Cianofagii SM-1 sunt specifici cianobacteriilor *Synechococcus elongatus* și *Microcystis aeruginosa*. Ei au o morfologie poliedrică și o dimensiune de 88nm. La *Nostoc muscorum* a fost identificat cianogfagul N-1, iar la *Anacystis nidulans* și *Synechococcus cedrorum*, cianofagul AS-1. Și la alte genuri de cianobacterii au fost identificați cianofagi.

Shestakov și Khyen (1970) au demonstrat experimental existența fenomenului de transformare mediată de ADN, la *Anacystis nidulans* 602.

Frecvențele de transfer ale markerilor **str**, **ery** și **fil** au variat între 0,004 și 0,07% și au fost cu mult mai ridicate decât rata mutației spontane, procesul fiind complet inhibat de DNază. Herdmann (1973/ a demonstrat transferul markerilor bio^+, nar^+, met^+, cys^+ și **str** la *Anacystis nidulans* UTEX 625 prin transformare, la frecvențe de până la 0,01%. Experiențe de transfer s-au mai efectuat la *Aphanocapsa* 6714, *Gloeocapsa apicola*, *Agmenellum quadruplicatum*.

Transformarea lui *Anacystis nidulans* R-2 cu plasmidul pR146 de *Escherichia coli*, care conține transpozonul Tn 901 ce poartă gena β-lactamazei și conferă rezistența la ampicilină, a generat forme rezistente la frecvențe joase (10^{-8}-10^{-9} per µg de ADN plasmidic) în urma transformării cu un plasmid cianobacterian purtător de Tn 901 (van del Hondel și colab., 1980).

CAPITOLUL XVI

GENE, PRODUȘI GENICI ȘI CARTARE GENICĂ LA CIANOBACTERII

1. INTRODUCERE

Genele cianobacteriene sunt organizate asemănător celor bacteriene, în operoni, unele dintre ele având structură mozaicată, evidențiată pentru prima dată de către Ming-Qun Xu și colaboratorii săi (1990), la două specii de *Anabaena*. Gena mozaicată cianobacteriană dirijează sinteza ARNt pentru leucină și conține un intron autoexcizat (ribozimă) din grupa I, identic ca poziție cu acela întâlnit în gena omoloagă din genomul cloroplastelor plantelor terestre. Cum cianobacteriile sunt considerate strămoșii cloroplastelor este admis faptul că intronii din grupa I au predatat evenimentele de endosimbioză a acestor eubacterii cu celulele eucariote.

Intronul grupa I din gena pentru ARNt pentru leucină are anticodonul UAA fiind întâlnit și în cloroplastele de mazăre, din mușchi (Hepatice), din frunzele de porumb, de orez și de tutun, precum și în cianela algei roșii *Cyanophora paradoxa*. Toți intronii grupa I prezintă un miez conservat al structurii secundare, iar secvențe înalt conservate sunt prezente și în alte poziții ale lor. Intronii de *Anabaena* (fig. 1) pot fi pliați în această structură secundară standard. Intronii de *Anabaena* au o asemănare puternică și în structura primară cu intronii cloroplastici și ai cianelelor, la nivelul miezului structurii secundare. Dintre 156 poziții omoloage ale miezului intronului, *A. azollae* este identică cu *C. paradoxa*, în 127 (81% similitudine), iar cu *Marcantia polymorpha* (mușchi hepatice), în 114 poziții (73% similitudine). Cum este și de așteptat, intronii de la *Anabaena azollae* și *Anabaena* PCC 7120 au o identitate de 89%, diferind doar prin 17 poziții, în cadrul acelorași regiuni comparate.

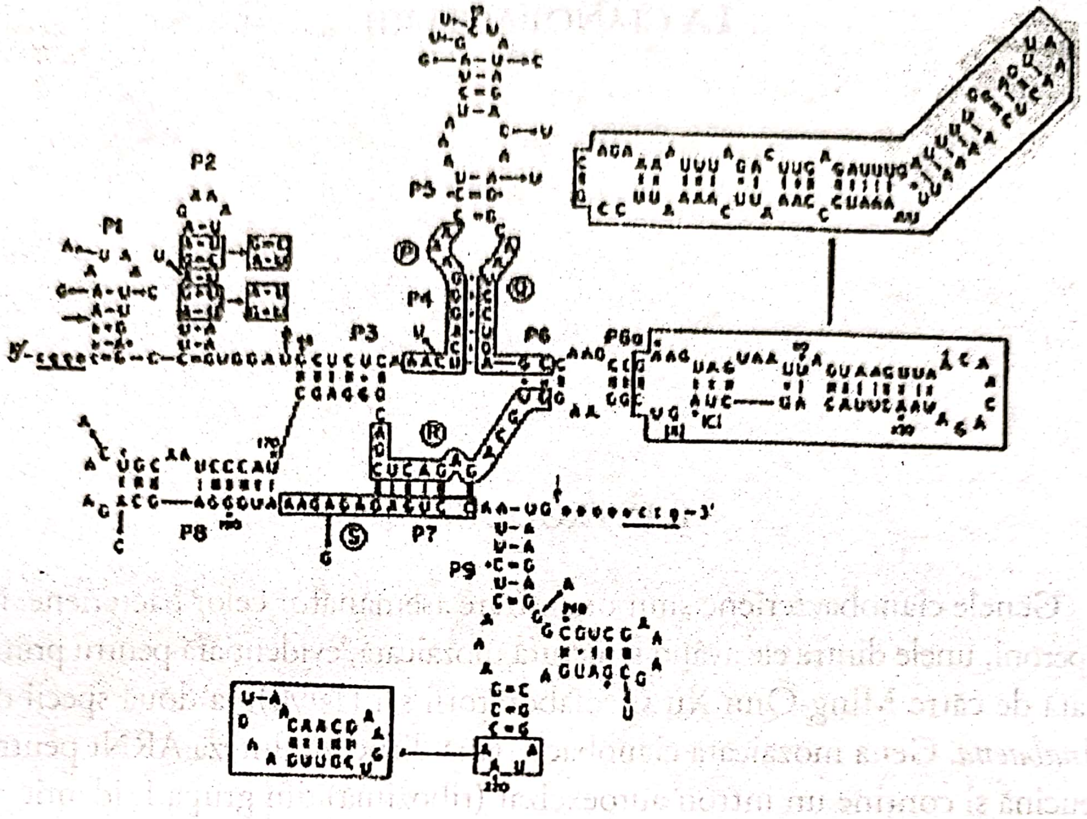


Fig. 1 — Structura secundară a intronului de la Anabaena PCC 7120. Secvențele exonice sunt în dreptunghiurile de jos, iar cele intronice în dreptunghiurile de sus. Situsurile de clivaj sunt indicate prin săgeți scurte și groase. Structura secundară conservată (P1-P9) este redată în această figură, iar elementele de structură primară (P, Q, R și S) sunt încercuite. În paranteze sunt trecute diferențele de secvență dintre două clone PCR, la pozițiile 139 și 141. Prin săgeți se indică schimbările nucleotidice în intronul de A. azollae. Sunt subliniate nucleotidele din bucla anticodonului ARNt (din Ming-Qun Xu și colaboratorii, 1990).

Intronii din grupa I au fost descriși și la cianobacterii distant înrudite, incluzând *Synechocystis*.

La *Anabaena* PCC 7120 au fost identificate prin utilizarea tehnicii hibridizării cu probe **nif**, de la *Klebsiella pneumoniae*, patru gene **nif**, desemnate **nif H**, **nif D**, **nif K** și **nif S**, primele trei codificând pentru componentele polipeptidice ale complexului nitrogenazic, iar ultima implicată, ca și la *K. pneumoniae*, în maturarea nitrogenazei. Prin utilizarea probelor **nif** de la *Anabaena* au fost identificate gene **nif** la alte specii unicelulare și filamentoase de cianobacterii.

Multe dintre genele cianobacteriene au fost clonate, așa cum rezultă din tabelul 1.

Tabelul 1. Gene cianobacteriene care au fost clonate (după Priya Sethu și colab., 1996)

Gena	Codifică pentru	Organismul de la care provine gena
rbc L	subunitatea mare a ribulozobifosfatcarboxilazei	*Anabaena* 7120 *Chlorogloeopsis* 6912 *Spirulina* *Synechococcus* 6301
rbc S	subunitatea mică a ribulozobifosfatcarboxilazei	*Anabaena* 7120 *Chlorogloeopsis* 6912 *Spirulina* *Synechococcus* 6301
psa A, B	apoproteine clorofila a P700	*Synechococcus* 7002
psb A	proteina Q_B (32 kD)	*Anabaena* 7120 *Calothrix* 7601 *Synechococcus* 7942
psb B	proteina CP 47	*Synechocystis* 6803
wox A	proteina 33 kD extrinsecă	*Synechococcus* 7942
pet F	feredoxin I	*Anabaena*
ppc	fosfofenolpiruvat carboxilaza	*Synechococcus* 6301
trx A	tioredoxin	*Anabaena*
atp	proteinele complexului ATP sintaza	*Synechococcus* 6301
atp B	subunitatea beta a ATP-azei	*Anabaena*
atp E	subunitatea epsilon a ATP-azei	*Anabaena*
cpc A	subunitatea alfa a C-ficocianinei	*Anabaena* și altele
cpc B	subunitatea beta a C-ficocianinei	*Anabaena* și altele
cpe A	subunitatea alfa a ficoeritrinei	*Calothrix* 7601
cpe B	subunitatea beta a ficoeritrinei	*Calothrix* 7601
apc A	subunitatea alfa a aloficocianinei	*Synechococcus* 6301
apc B	subunitatea beta a aloficocianinei	*Synechococcus* 6301
cpc C,D,E	polipeptide linker ale ficobilisomilor	*Anabaena* 7120
ipc A,B,C	polipeptide linker ale ficobilisomilor	*Calothrix* 7601
apc C	polipeptide linker ale ficobilisomilor	*Synechococcus* 6301

Au fost clonate genele **nif D, nif K, nif H, xix A** , **gln A** și **nar** care dirijează sinteza enzimelor implicate în fixarea azotului molecular de la *Anabaena*, *Spirulina* și *Synechococcus* și care codifică pentru subunitatea α a dinitrogenazei, subunitatea β a nitrogenazei, nitrogenaza-reductaza, enzima de excizie, glutamin sintetaza și, respectiv nitroreductaza (Priya Sethu și colab. 1996).

La *Synechococcus* 6301 au fost identificate genele **rrn A, B** pentru ARNr 23S, ARNr 16S și ARNr 5S și gena **trnI**, pentru ARNt^{Ile}. La *Spirulina* s-au descris mai multe gene: **trnA**, pentru ARNt^{Ala}, **tuf A**, pentru factorul de elongație G, **tsf**, pentru factorul de elongație Ts, **rps 12** pentru proteina ribozomală S12, **rps** 7, pentru proteina ribozomală S7, **rps2**, pentru proteina ribozomală S2. La *Calothrix* 7601 s-au descris genele **gvpA, B** și **C** pentru proteinele veziculelor gazoase, iar la *Anabaena* s-a identificat gena **rec** A, pentru proteina **rec** A, având efecte pleiotropice, ca și la bacterii. La *Synechococcus* 6308, 7002 și 7942 au mai fost caracterizate genele **arg, leu, met** și **thi 1**.

Genele pentru apoproteinele ficobiliproteinelor clonate din ADN cloroplastic de *Cyanophora paradoxa* au fost utilizate pentru identificarea genelor pentru ficocianine, de la *Calothrix* și pentru aloficocianine, de la *Synechococcus*. Tot astfel, gena pentru subunitatea mare a ribulozo-bifosfat carboxilazei din cloroplastele de spanac sau de *Chlamydomonas reinhardti* au fost utilizate pentru izolarea genei corespunzătoare de la *Synechococcus* 6301 și *Spirulina*, iar aceea pentru proteina de 32Kd din spanac și porumb a fost utilizată pentru izolarea genei similare din *Calothrix, Nostoc, Synechococcus* și *Anabaena*.

Prin utilizarea tehnologiei ADN recombinant au putut fi izolate și caracterizate și alte gene ale cianobacteriilor. Peste 200 de gene cianobacteriene au fost clonate, dintre care doar unele au fost secvențiate, printre acestea fiind gena pentru nucleaza exocitoplasmatică nespecifică pentru zahăr, gena pentru nitrit-reductază, gena pentru fitoenă-sintetază, gena pentru NADP$^+$ izocitrat-dehidrogenază, gena pentru proteaza de procesare a capătului carboxil, gena senzorikinazei, gena pentru sinteza tetrapirolului, gena pentru formarea carboxizomului, gena pentru utilizarea carbonului anorganic, gena **dna K**, gena activazei Rubisco, gena fotoliazei, gena enzimei de ramificație, gena pentru maturarea preheterocistului și multe altele, cele mai multe fiind implicate în mecanismele fotosintezei și fixării azotului.

Ribulozo-1,5–bifosfat carboxilaza (RuBPCaza) are o subunitate mare și o subunitate mică la plantele superioare, gena pentru subunitatea mare (**rbc L**) se află în ADN cloroplastic, pe când gena care codifică subunitatea mică (**rbc S**) se află în ADN cromozomal. În celulele vegetative de cianobacterii, deși RuBPCaza constă, de asemenea, din două subunități, genele pentru aceste subunități se află localizate în ADN cromozomal. Expresia genelor **rbc LS** la cianobacterii este controlată de fotoperioada zilnică, lumina putând amplifica transcripția genei **rbcL** (Chow și Tabita, 1994). Transcrierea acestei gene nu mai are loc după transformarea celulei vegetative în heterocist.

2. GENELE PENTRU FICOBILIPROTEINE

Ficobilisomul conține ficocianobilina (PC), ficoeritrobilina (PE), aloficocianobilina (APC) și proteina linker (L). PC, PE și APC sunt alcătuite dintr-o subunitate α și o subunitate β, în proporții specifice fiecăreia dintre aceste ficobiliproteine.

În operonii **cpc, cpe** și **apc** se află genele care codifică subunitatea α și subunitatea β ale acestor ficobiliproteine. În operonul **apc, gena apc A** se află în amonte de gena **apc B**, pe când în ceilalți operoni, această genă se află în aval de gena care codifică pentru subunitatea α. În opinia lui Zhou și a colaboratorilor săi (1992), operonul **cpc**, de la *Synechococcus* sp. PCC 7002, cuprinde șase gene cpc BACDEF, dintre care genele cpc CD codifică pentru polipeptidele linker. Dar, alți autori consideră că acest operon de la *Anabaena* sp. PCC 7120 conține zece gene, dintre care **cpc CD** și **cpc G1 G2 G3 G4** codifică pentru polipeptidele linker (Bryant și colab., 1991). Genele **cpc E** și **cpc F** codifică pentru ficocianobilin liaza, legată de cromoforilare (Zhou și colab., 1992). Produșii genelor **cpc E** și **cpc F** mediază transferul bilinei la α-84 cisteină (Swanson și colab., 1992).

Operonul cpc B3A3 este legat de sinteza α PC3 și β PC3, dar deocamdată, nu se cunoaște funcția acestora (Tandeu de Marsac, 1982). Au fost clonate și secvențiate genele **cpc AB** ce codifică subunitățile α și β, ca și genele **cpc CDE** ce codifică polipeptidele linker PE, la *Calothrix* sp. PCC 7601. Au fost secvențiați promotorii acestor gene și s-au evidențiat secvențe scurte repetate, la terminalul 5' al acestor operoni. Promotorii sunt localizați în regiunea de la -67 până la –45, din amonte de situsul de inițiere a transcripției. S-au izolat proteine ce se leagă la promotor. Transcrierea genelor cpc la cianobacterii este reglată de gena reglatoare **RcaD**, inductorul fiind lumina verde.

Proteinele miezului ficobilisomal sunt transcrise și traduse în principal din operonul **apc E A1B1C**. În amonte de acest operon se află operonul **apc B2A2HID** care este transcris și tradus în αPC2 și βPC2 și polipeptidele linker LRPC 2–37.5, LRPC 2–39 și LRPC-9 (Fuglistaller și colab., 1985; de Lorimier și colab., 1990).

3. GENELE PENTRU SISTEMUL FOTOSINTETIC

Cianobacteriile posedă atât sistemul fotosintetic I-PSI, cât și sistemul fotosintetic II-PSII, realizând fotosinteză aerobică (oxigenică).

Cercetările lui Houmard și Tandeau de Marsac (1988) au studiat genele implicate în procesul de fotosinteză. Genele PSI sunt **psa A, psa B,** și **psa E**, iar genele PSII sunt desemnate **psb A, psb B, psb C, psb D, psb E, psb F, psb I,** și **psb J**. Au fost clonate genele **psa C** din PSI, de la *Synechococcus* sp. și genele **psb G, psb H, psb K** și **psb O** din PSII, de la *Synechocystis* sp. (Rhiel și colab., 1992; Steinmuller și colab., 1991; Race și Gounaris, 1993; Mayes și colab., 1993; Zhang și colab., 1993). S-au secvențiat genele **psa ABC** și **psb AB** (Ralf și colab., 1993; Kulkarni și colab., 1993; Nyhus și colab., 1994; Herman și colab., 1994). Li și Cohen (1993) au analizat mecanismul expresiei genei **psb A** reglată la lumină, la cianobacterii.

4. REARANJAMENTUL GENELOR FIXATOARE DE AZOT, ÎN CURSUL DIFERENȚIERII HETEROCISTULUI

Celulele vegetative ale unor specii de cianobacterii filamentoase se pot diferenția în heterociști, în condiții de sărăcire a mediului de cultură în amoniu sau nitrat, fixarea azotului molecular de către cianobacteriile filamentoase având loc doar în heterociști. Diferențierea heterocistului este asociată cu rearanjamentul unora dintre genele fixatoare de azot din vecinătatea operonului **rbc LS** (Thiel, 1993).

La *Anabaena* sp. PCC 7120 s-au descris trei operoni legați de fixarea azotului: **nif HDK, nif BNSV, nif EXW**. În operonul **nif HDK, nif DK** codifică pentru proteina FeMo, pe când **nif H** codifică pentru proteina Fe (Lammers și Haselkorn, 1989). La *Anabaena* sp. PCC 7120, în cursul diferențierii heterocistului are loc o recombinare cu specificitate de situs dintre o secvență direct repetată de 11 perechi de baze, ce flanchează genele **nif K** și **nif D**, eliminând un fragment de ADN interpus de 11Kb, ceea ce conduce la juxtapoziționarea celor două gene, permițând astfel transcrierea și traducerea coordonată a genelor **nif DHDK** (Golden și colab., 1985, 1991).

Rearanjamentul genic a fost evidențiat și în operonul **nif BNSV**, cu excizia unui fragment de ADN de 55Kb. Excizii de 70Kb ADN, dintr-un segment de 300Kb, și a unui fragment de 18Kb, dintr-un segment de 600Kb ADN, au fost evidențiate în cursul diferențierii heterociștilor la *Anabaena* sp. PCC 7120. Excizia fragmentului de 70Kb ADN are drept consecință activarea funcției de fixare a azotului (Matveyev și colab., 1994). Gena **XISA**, localizată într-un fragment de 11Kb ADN este cerută pentru realizarea rearanjamentului și expresia genelor **nif DK**. Această genă **XISA** codifică o excizază care intervine în rearanjamentul genelor **nif HDK** și este exprimată numai în stadiul târziu de diferențiere a heterocistului (Golden și colab., 1988; Brusca și colab., 1990). Fără activarea genei **XISA** nu poate avea loc excizia fragmentului ADN de 55Kb din operonul **nif BNSV** (Carrasco și colab., 1994). În amonte de gena **nif A** se află gena **bif A** (gena **vf I** sau gena **ntc A**) care codifică pentru o proteină ce manifestă proprietatea de legare la ADN. Dacă gena **nif A** suferă mutație, nu poate avea loc rearanjamentul genelor **nif** și nici diferențierea heterociștilor și, ca urmare, este anulată capacitatea cianobacteriei de a fixa azotul molecular (Chris și colab., 1990; Wei și colab., 1993, 1994; Frias și colab., 1993; Ramasubramanian și colab., 1994). Este evident faptul că genele **pkn A** și **het A** sunt implicate în diferențierea heterocistului și fixarea azotului molecular la cianobacteriile filamentoase (Zhang, 1993; Holland și Walk, 1990; Black și colab., 1993; Black și Walk, 1994).

O hartă genetică de lincaj, limitată, a fost realizată în anul 1973, de către Herdman, la *Anacystis nidulans* UTEX 625, utilizând doi markeri **bio-1** și **str-2** și transformarea cu ADN extras chimic.

Un al doilea sistem de cartare genică este cartare genică temporală prin care s-a măsurat poziția unei gene raportată la originea replicării cromozomale, după frecvența sa de mutație, în cursul replicării sincrone a genomului, și a fost aplicat la *Anacystis nidulans* UTEX 625, de către Asato și Folsome (1970) și de către Delaney și Carr (1975). Aplicarea pulsatorie a NTG, respectiv a EMS, de către cele două echipe, a dat pick-uri clare ale frecvenței mutațiilor (corespunzând momentului de replicare a genei) pentru 6 și respectiv 19 markeri, măsurată ca reversie a auxotrofilor sau mutații „înainte“, de rezistență la droguri sau mutații pigmentare. Cele două hărți au ocupat diferite durate de timp (420 minute și respectiv 60 minute), datorită ratelor diferite cu care s-a replicat cromozomul, în cele două experimente. Dar, readuse la aceeași scară, s-au obținut concordanțe de poziție pentru markeri comuni **pmrA, blu A** și **yel A**. pozițiile în harta genetică pentru markerii **sna** și **fil** nu au fost corespondente, deși ambii sunt implicați în diviziunea celulară, aceștia nefiind însă strâns lincați. La fel, nestrâns linkați s-au dovedit a fi și markerii **met-2** și **met-4**, respectiv **pmr A** și **pmr B**. Mutantele **yel A** și **blu A** afectează sinteza ficocianinei și cartează la fel, cel puțin în patru poziții bine separate, ceea ce, în opinia lui Delaney și Carr (1975) este un indiciu al absenței clusterilor de gene înrudite, care apar la bacterii. Numai **bio-1** și **bio-2** apar a fi grupate, deși nu se exclude ca ambele aceste mutații să fie în aceeași genă. Un supresor al lui **bio**, desemnat **sup A**, se cartează într-un situs separat. Analiza genetică a cianobacteriilor s-a bazat inițial pe markerii biochimici (auxotrofi), dar analiza mai atentă a auxotrofilor a dovedit că fiecare auxotrof (Leu-, Arg-Trp-, etc) marca, în fapt, regiuni complexe, multigenice, ale cromozomului cianobacterian, auxotrofii pentru același factor (aminoacid, nucleotid, vitamină, glucid, etc.) erau heterogeni și prezentau deficiențe în enzimele implicate în sinteza factorului pentru care manifesta auxotrofie. Markerii indicatori de loci genici au fost utilizați, ca și la bacterii, în analiza genetică fină a genomului cianobacterian.

Genele pentru ARNr se află dispuse în doi clusteri, genele 16S, 23S și 5S fiind lincate în cadrul fiecărui cluster ca și la *Escherichia coli*. Dimpotrivă, genele structurale **nif**, de la *Anabaena* PCC 7120, sunt dispersate pe o mare parte a genomului (Mazur și colab. 1980), acest aranjament fiind astfel diferit de acela al genelor **nif** de la *Klebsiella.*

S-a dovedit că cel puțin unele gene **nif**, de la *Anabaena* PCC 7120, *Anabaena variabilis* UTEX 1444 și *Plectonema baryanum* UTEX 594 sunt omoloage cu cele de la *Klebsiella pneumoniae* (Mazur și colab., 1980; Ruvkin și Ausubel, 1980). Există o extinsă omologie de secvență între genele structurale **nif K, D** și **H** de la *Anabaena* 7120 și *Klebsiella*, dar ordinea genelor la aceste două microorganisme fixatoare de azot este diferită, genele **nif** structurale de la *Anabaena* fiind distribuite pe un segment ADN de cel puțin 30 Kb, pe când la *Klebsiella* acestea sunt dispuse pe un segment de 6 Kb. Plasmidele de la *Anabaena* 7120 nu au hibridizat cu probe de gene **nif** cu localizare cromozomală. Produsul genei **nif H** este o proteină cu GM=33 000 daltoni, care precipită selectiv cu antigeni față de reductaza nitrogenazică de *Anabaena.* S-a stabilit secvența de aminoacizi a acesteia. Nu s-au putut identifica încă secvențe promotoare.

CAPITOLUL XVII

TOXINELE CIANOBACTERIILOR

Încă din anul 1878 au fost descrise efectele toxice și uneori fatale ale apelor în care se dezvoltă luxuriant cianobacteriile. Unele tulpini de *Nodularia* și de alte genuri de cianobacterii produc toxine foarte puternice care omoară oile în decurs de 1–6 ore, caii în decurs de 8–24 ore, câinii, în decurs de 4–5 ore și porcii în decurs de 3–4 ore. Cele mai puternice toxine cianobacteriene sunt produse de *Anabaena flos-aque și Microcystis aeruginosa*. Toxina produsă de *Nodularia spumigena* afectează cu mare specificitate ficatul, în special vasele sangvine hepatice, determinând hemostaze la nivelul acestui organ. Alte toxine cianobacteriene au acțiune specifică asupra sistemului nervos, fiind neurotoxine care mimează acetilcolina.

Toxina produsă de *Anabaena flos-aque* (fig. 15) s-a numit **anatoxina-A**. Aceasta nu poate fi degradată de acetilcolin-esterază și, ca urmare, atunci când este ingerată în cantitate mare de animal, provoacă contracția continuă a musculaturii, cu producerea de convulsii și sufocare. Nu s-a putut produce un antidot împotriva acestei toxine cianobacteriene. Dar se fac unele cercetări în vederea utilizării sale în tratarea bolii Alzheimer care are la bază distrugerea neuronilor producători de acetilcolină. Și derivatul S al acestei anatoxine-A este investigat în scopuri medicale. Anatoxina A (S) produce salivație abundentă la animalele care au ingerat-o. Ea are o grupare fosfat și acționează precum insecticidele organofosforice de tip paration și melation. Această anatoxină A este, se pare, singurul organofosfat produs pe cale naturală. Acțiunea sa este aceea de blocare a activității acetilcolin-esterazei și astfel acetilcolina nu poate fi degradată, determinând supracontracția musculară. Anatoxina-A (S) este investigată și pentru proprietățile sale potențiale de insecticid. Neurotoxinele saxitoxina și neosaxitoxina sunt produse de

Anabaena și *Aphanizomenon*, dar și de dinoflagelate marine. Ele distrug semnalizarea normală dintre neuroni și mușchi, producând moartea prin paralizia mușchilor respiratori și sufocare. Hepatotoxinele cianobacteriene pot inhiba proteinfosfatazele. Dozele neletale ale acestor toxine ar putea fi utilizate și în tratamentul maladiei canceroase. Toxinele cianobacteriene

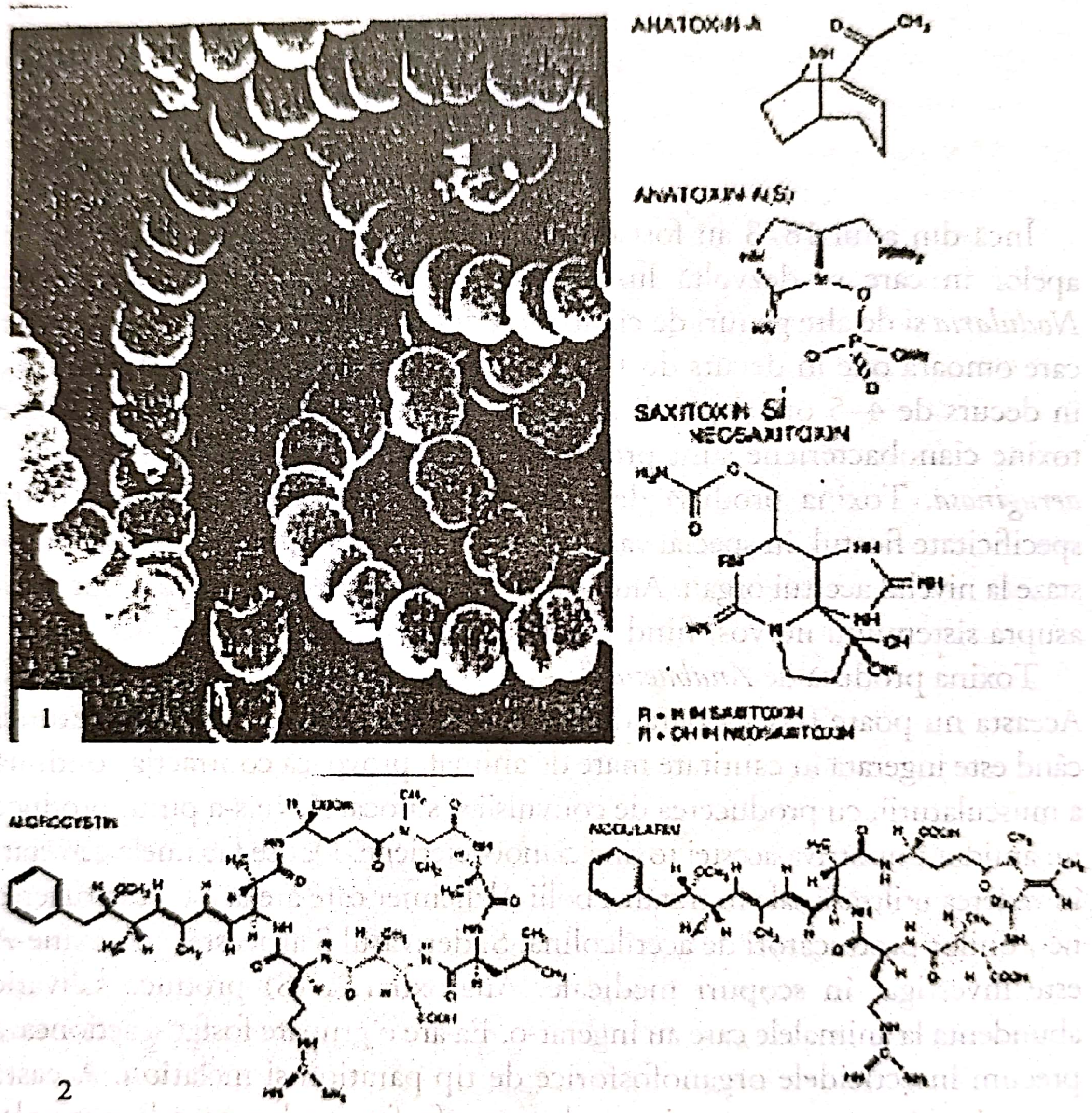

1
ANATOXIN-A
ANATOXIN A(S)
SAXITOXIN ȘI NEOSAXITOXIN
R = H IN SAXITOXIN
R = OH IN NEOSAXITOXIN
2
MICROCYSTIN
NODULARIN

Fig. 1 — *Anabaena fols-aquae* (stânga) mărită de 2.500 de ori. Această cianobacterie este producătoare de neurotoxine prezentate ca formule în partea dreaptă (1). În (2) sunt prezentate toxinele care distrug hepatocitele, acestea fiind peptide alcătuite din șapte aminoacizi numită *(microcistină)* și din cinci aminoacizi *(nodularină)*.

numite *microcistina* și *nodularina* pot încetini dezvoltarea tumorală. Acestea sunt peptide de 7 și respectiv 5 aminoacizi.

Cum *Spirulina* este utilizată de populațiile lacustre ale Ciadului și Mexicului și este desigur comercializată ca medicament tonifiant, trebuie avut grijă ca producerea de biomasă de *Spirulina* să fie strict controlată pentru a nu fi contaminată cu alte genuri de cianobacterii, producătoare de toxine.

CAPITOLUL XVIII

CERCETĂRI ROMÂNEȘTI ASUPRA GENETICII CIANOBACTERIILOR

În investigațiile noastre (Gavrilă, 1978, Gavrilă și Mihăescu, 1982 a, b, Gavrilă și Gavrilă, 1985, Maniu, 1985 a, b) au fost abordate aspecte referitoare la diviziunea celulară și multiplicarea cianobacteriilor, în cazul „înfloririi apelor“, la efectul nitrozoguanidinei asupra cianobacteriilor unicelulare și filamentoase, la analiza electronomicroscopică a nucleoidului cianobacterian și la cartarea unor markeri genetici într-o hartă genetică temporal-spațială.

Diviziunea celulară prin sciziparitate cu formarea unui septum a fost analizată în microscopia optică și electronică, evidențiindu-se un aspect interesant și anume acela că înainte de a se realiza diviziunea celulară are loc mai întâi diviziunea nucleoidului.

Implicarea unei structuri de tip mezosomal în segregarea nucleoizilor fii a fost adesea evidențiată. cele mai aprofundate investigații au fost efectuate la *Synechococcus elongatus*. Forma normală a cestei cianobacterii este de baghetă cilindrică, lungă de 4–6 μm și diametru de 1,4–2 μm, având capete rotunjite. Diviziunea celulară este de tip sciziparitate cu formare de septum. Sub acțiunea nitrozoguanidinei apar anomalii, în special mutante filamentoase, de 10–15 ori mai lungi decât tipul normal, uneori prezentând ramificații reale, dihotomice. La unele forme apar distorsiuni neregulate, încolăcite, spiralizate. La nivel ultrastructural nu s-au putut evidenția diferențe între tipul normal și asemenea mutante. În unele situații, a fost evidențiată o delimitare clară a nucleoidului față de citoplasmă prin intermediul unor structuri de tip tilacoid.

La *Nostoc*, tratamentul cu nitrozoguanidină a indus un spectru foarte larg de forme cu anomalii ale diviziunii celulare, incluzând distorsiuni și ramificații reale ale filamentului (fig. 1). Formarea de asociații celulare pseudotisulare în cadrul uni filament și prezența de multipli heterociști în același filament reprezintă efectul acțiunii mutagene a nitrozoguanidinei asupra genelor implicate în citodiferențiere. Tot astfel, au fost identificate unele filamente foarte lungi, în care apar doar celule vegetative, nediferențiindu-se nici un alt tip celular (heterociști, akineți sau necrocite). Acesta poate fi interpretat în sensul blocării sub acțiunea nitrozoguanidinei a mecanismelor citodiferențierii, în cazul heterociștilor și akineților precum și al apoptozei (moarte celulară naturală, programată genetic), în cazul necrocitelor (nanocitelor).

La *Nostoc* au apărut și mutante de pigmentație galbene (**yel**) sau albastru închis (**dark blue**). Au fost identificate, de asemenea, conective și chiar fuziuni celulare ale celulelor de la capetele a două filamente de *Nostoc*, ceea ce a fost interpretat în sensul activării prin acțiunea mutagenului a genelor legate de procese parasexuale la cianobacterii.

Încă din anul 1982, Gavrilă și Mihăescu au interpretat necrocitele (necridiile) drept celule „sinucigașe“, menite ca prin descompunerea lor să fie realizată fragmentarea filamentului în mai multe trichome și reluarea ritmului intens de diviziune la nivelul acestora cu proliferarea rapidă a cianobacteriilor.

Pe de altă parte, prezența anastomozelor între două filamente distincte poate fi interpretată în termenii activării mecanismelor parasexuale ale transferului de gene pe orizontală, incluzând transfer interregn.

Apariția de forme filamentoase, lungi, la o celulă de tip bacterian, cum este aceea de *Synechococcus elogatus* (fig. 2), denotă un fapt remarcabil, anume acela că într-o asemenea celulă este depozitată și menținută sub o formă silențiată, informația genetică pentru morfogeneza filamentului. Apariția formelor filamentoase de cianobacterii din forme unicelulare a fost un proces complex, realizat prin acțiunea forțelor evoluției, printre care mutația și presiunea selectivă au jucat rolul principal. Aceasta a condus la apariția pluricelularității și a heterotalismului, care în final a condus la diversificarea enormă a lumii vegetale. Compartimentalizarea unicului nucleoid cianobacterian (fig. 3) în mai multe zone care conțin ADN, prin intermediul unor membrane intracitoplasmatice, evidențiate în investigațiile noastre.

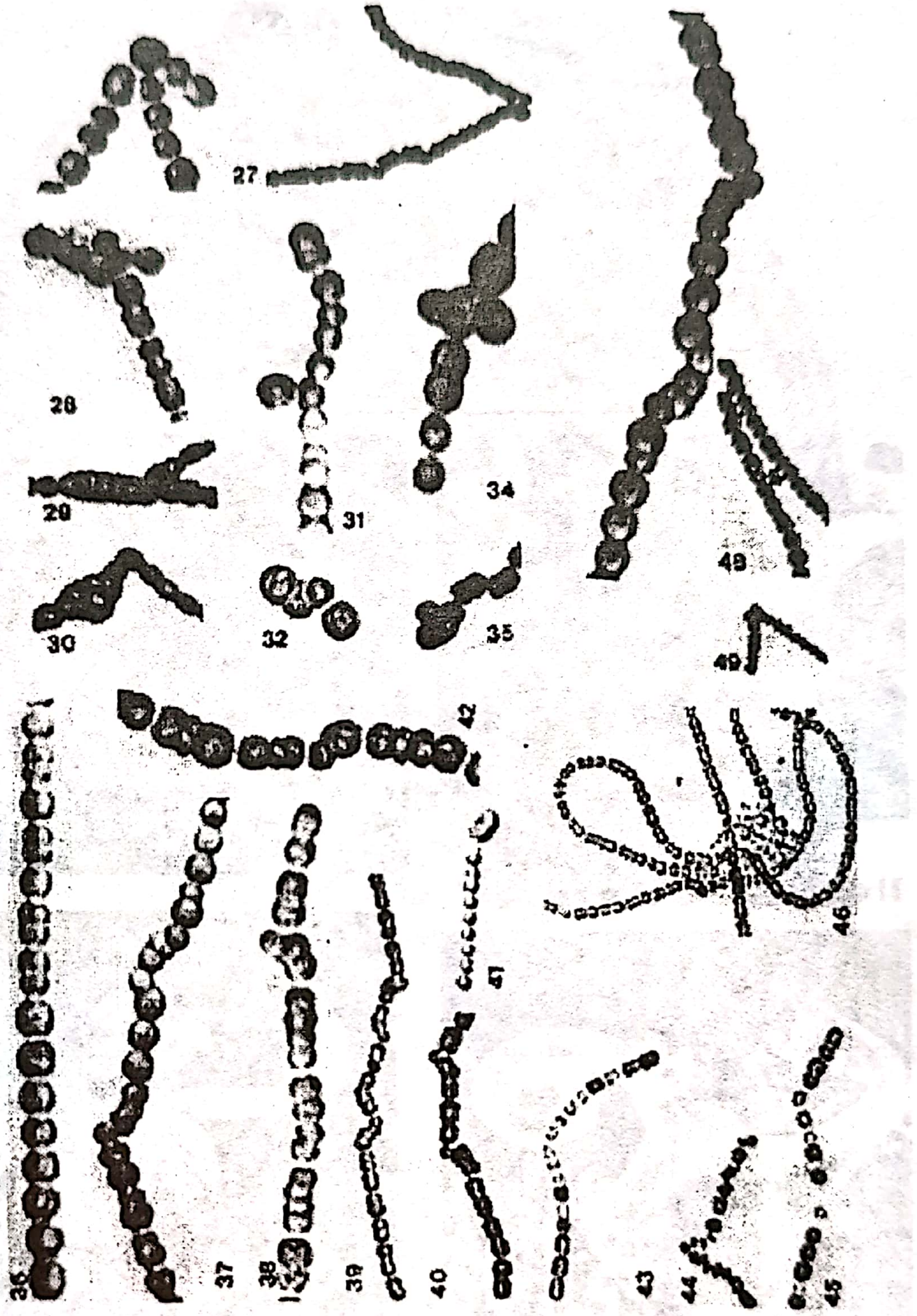


Fig. 1 — Mutante morfologice, de pigmentație și citodiferențiere apărute la *Nostoc sp.* sub acțiunea NTG. Ramificațiile veritabile, multipli heterociști, asociații celulare formând structuri asemănătoare unor țesuturi, fuziuni de celule terminale sau intercalare ale unor filamente distincte, precum și diferențierea unor necrociste multiple alături de contorsionări ale filamentelor, urmare a dereglării formării septum-ului de diviziune sunt cele mai frecvente (original).

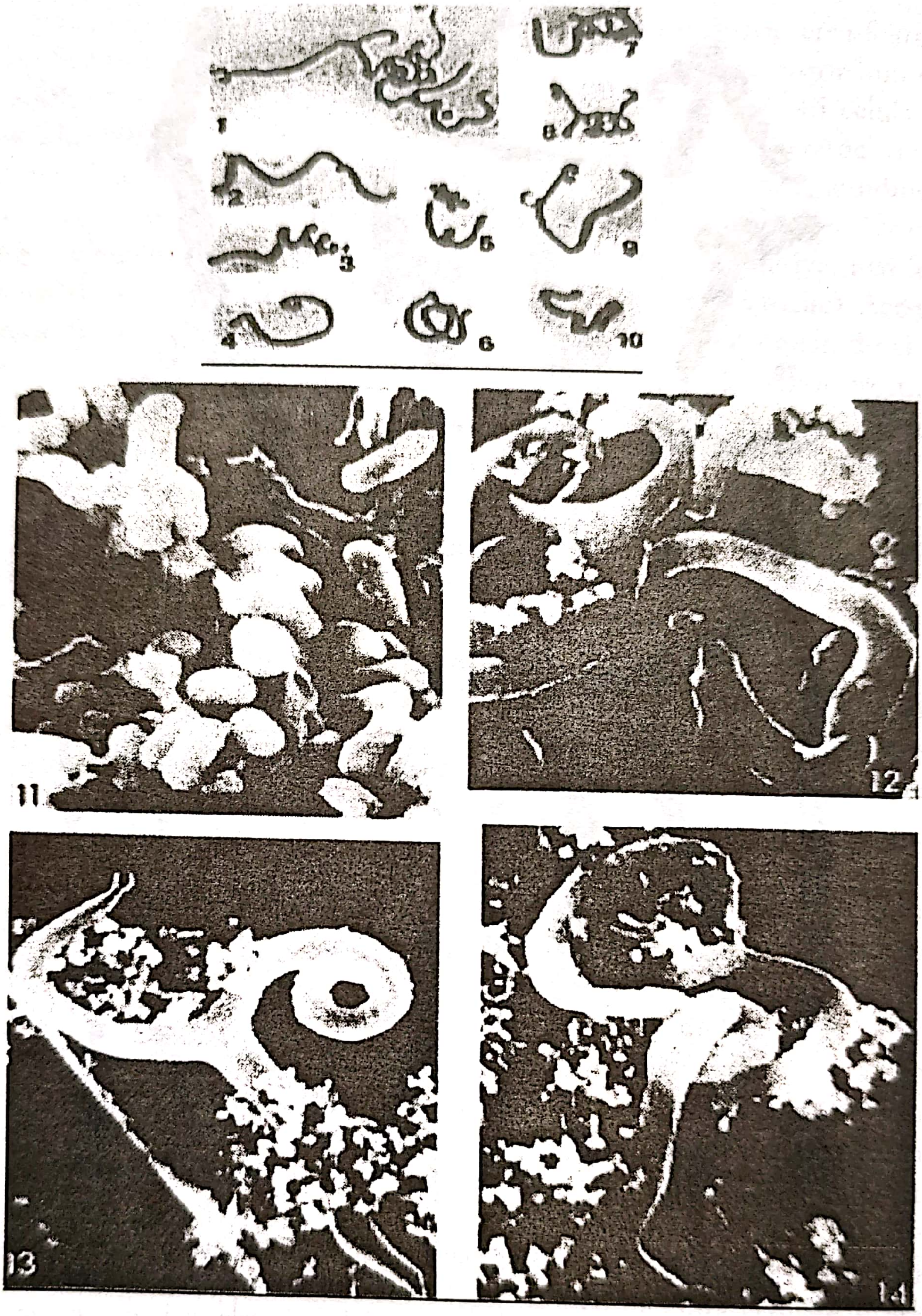


Fig. 2 — Mutante morfologice apărute la *Synechococcus elongatus* sub acțiunea nitrozoguanidei (NTG) și evidențiate cu ajutorul microscopului optic (1-10) și al microscopului electronic cu baleaj (11-14). Tipul normal apare în figura 11 (original).

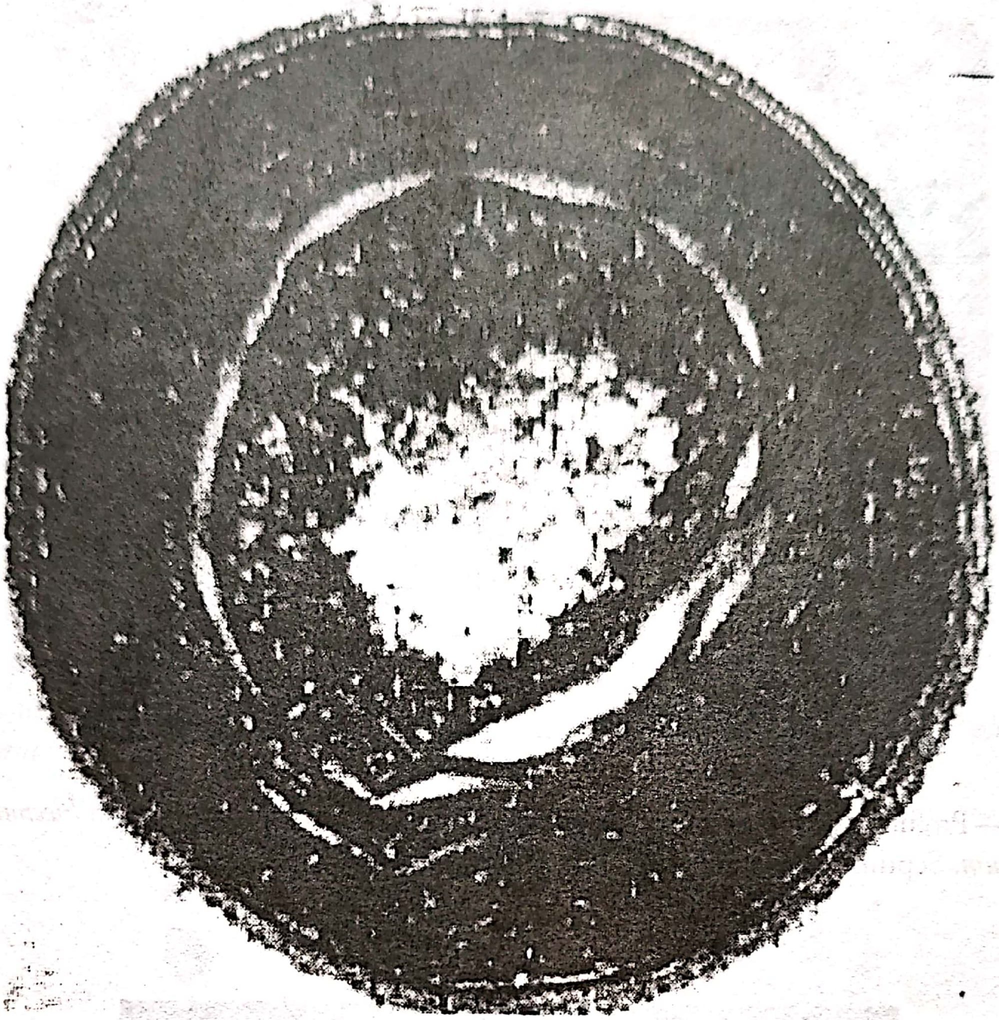


Fig. 3 — Ultrastructura cianobacteriei unicelulare *Synechococcus elongatus*
Se remarcă o regiune centrală care include și nucleoidul, delimitat de structuri membranare de origine tilacoidală (original).

Asemenea date ar putea constitui punct de reper în explicațiile privitoare la geneza organizării genetice eucariote.

Cercetările noastre ulterioare (Maniu și Gavrilă, 1985) au fost realizate pe alte genuri de cianobacterii precum *Plectonema boryanum* și *Spirulina platensis*.

Tratamentul cu nitrosoguanidină (NTG) a indus la *Plectonema boryanum* un spectru larg de mutante morfologice cu apariția de septum oblic în celulele care se divid, precum și a altor anomalii citologice și de pigmentație (fig. 4). În cadrul filamentului, celulele mutante sunt situate terminal sau sunt intercalate cu celulele normale. Distorsiunea septum-ului de diviziune conferă filamentului aspect de crosă de hokey, o fază tranzitorie

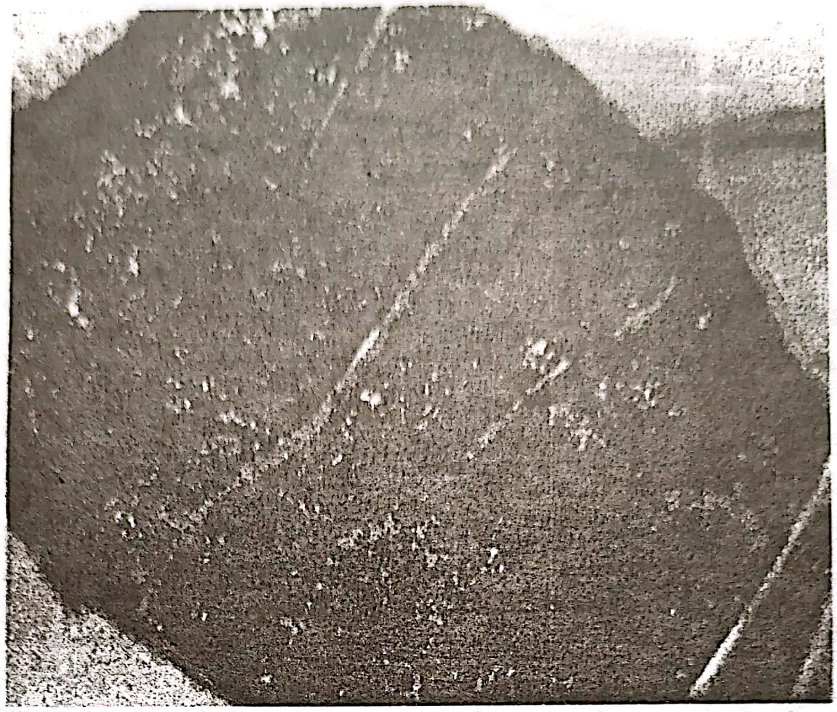


Fig. 4 — Profunde alterări în formarea *septului de diviziune* sub acțiunea NTG la *Plectonema boryanum*. Septul de diviziune are aspect sinuos. (original).

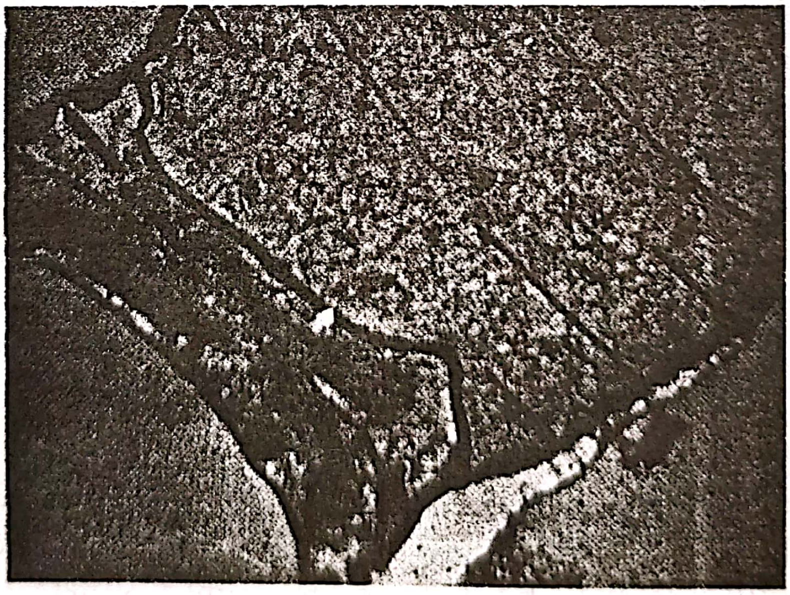


Fig. 5 — Mutante de pigmentație apărute la cianobacteria *Plectonema boryanum* în urma acțiunii NTG. S-a păstrat sistemul normal de formare a septului în unele celule. (original).

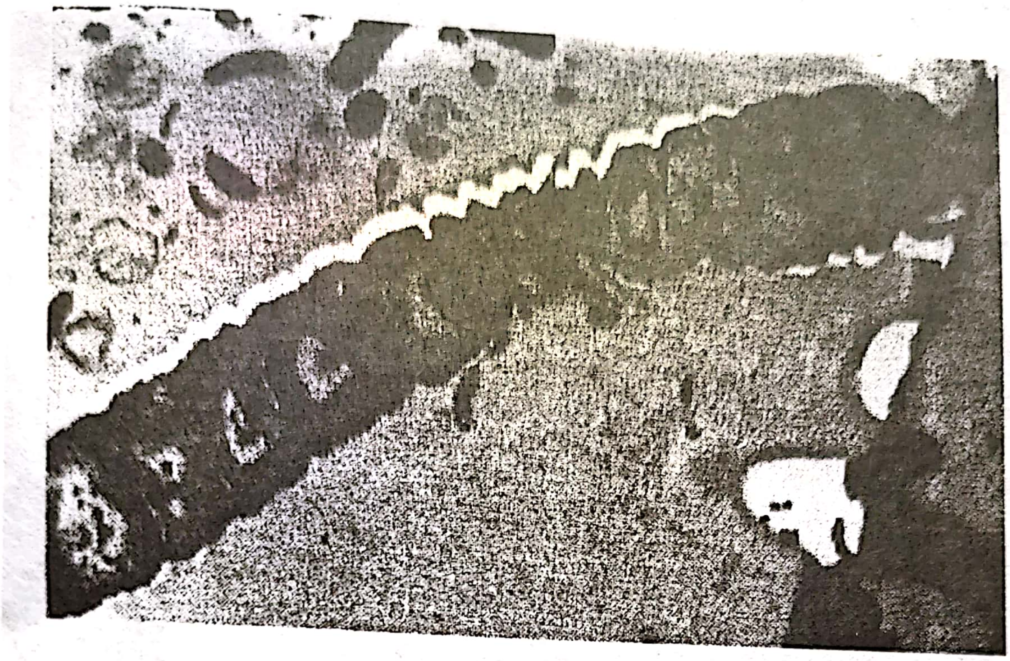


Fig. 6 — *Liza celulelor intercalare* ale filamentului ce duce la fragmentarea acestuia. Mutantele au fost obținute în urma acțiunii NTG asupra cianobacteriei *Plectonema boryanum*. Se observă apariția și a mutantelor de pigmentație *yellow* (original).

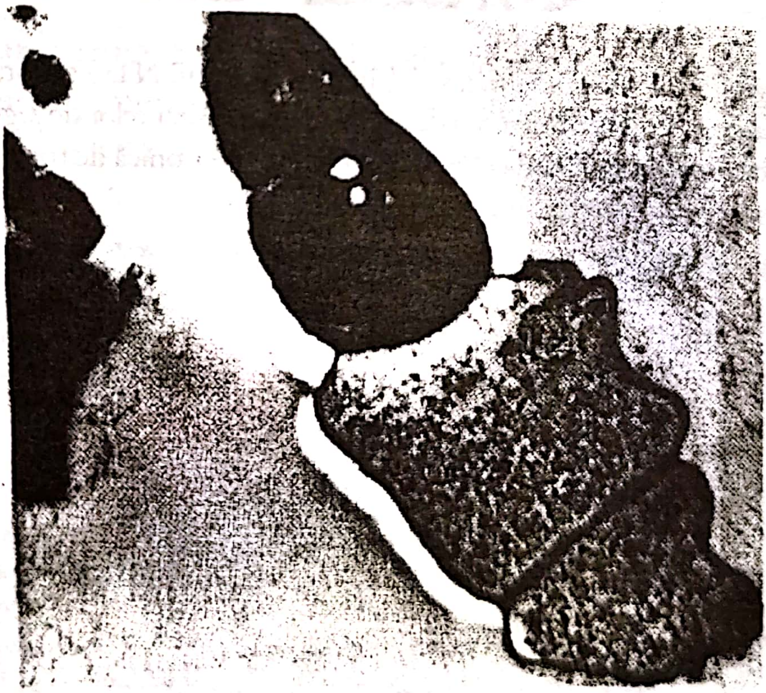


Fig. 7 — Celulele aceluiași filament de *Plectonema boryanum* răspund diferit la acțiunea aceleiași concentrații de NTG, în funcție de momentul în care bifurcația de replicare a ajuns în dreptul diferitelor gene, în aceste celule diferite. Se observă apariția de *minicelule* (original).

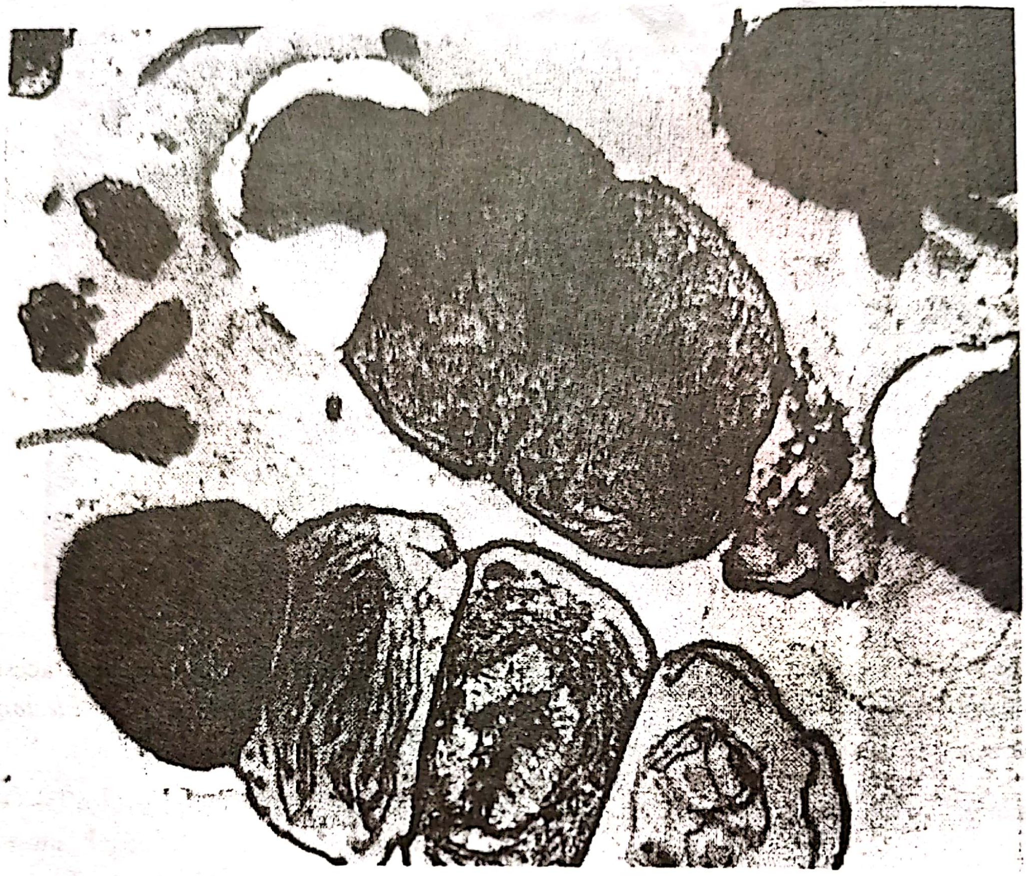


Fig. 8 — *Dezorganizarea sistemului tilacoidal,* în urma acțiunii NTG asupra cianobacteriei *Plectonema boryanum.* Se observă apariția de *minicelule* și a mutantelor de *pigmentație.* Septul de diviziune se formează normal. Imagine de microscopie electronică de transmisie (original).

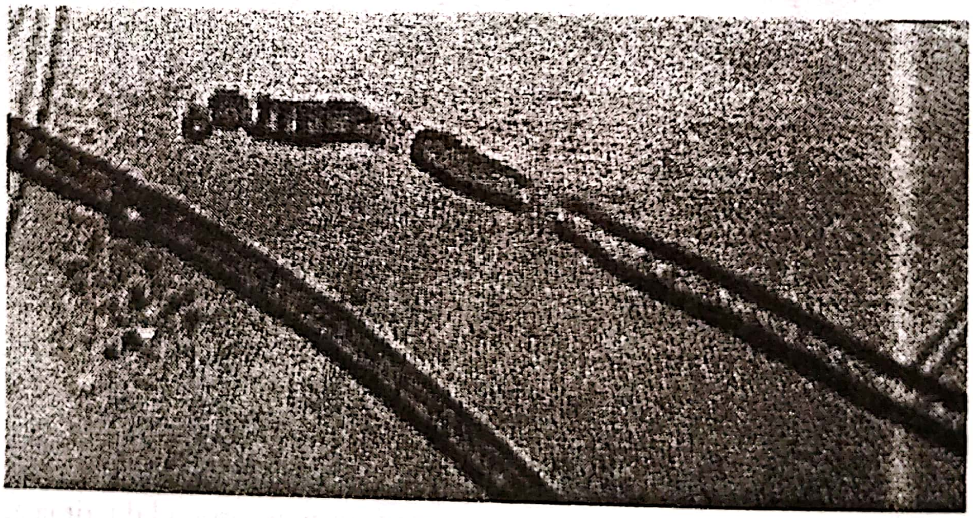


Fig. 9 — *Liza celulelor intercalare* în urma tratamentului cu NTG, la *Plectonema boryanum.* Se observă *modificări ale celulelor terminale.* Imagine la microscopul optic (original).

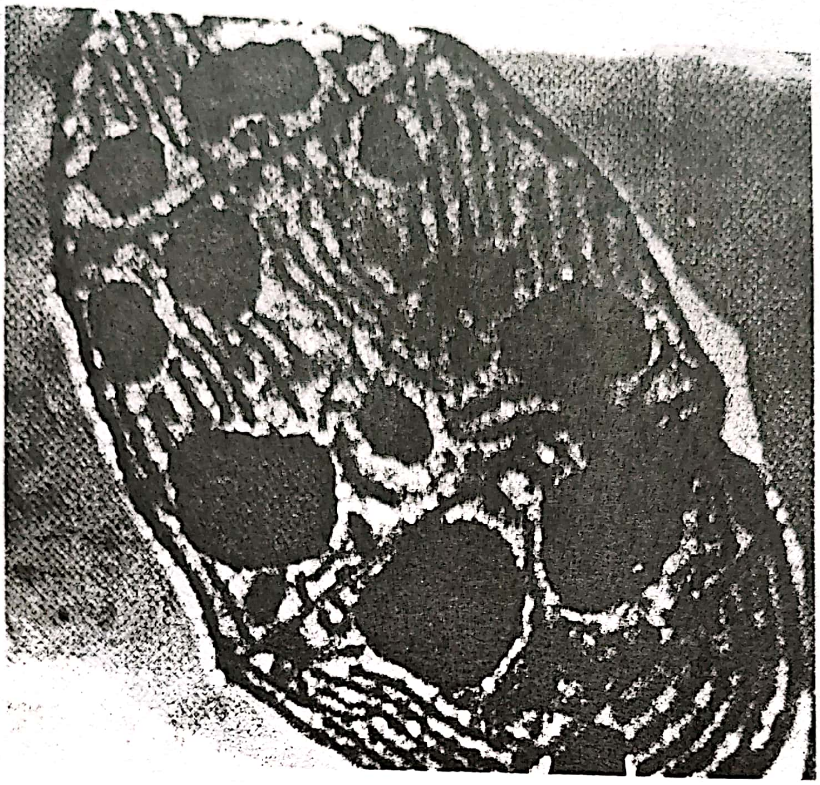


Fig. 10 — Mutantă de pigmentație, apărută în urma tratamentului cu NTG asupra cianobacteriei *Plectonema boryanum*. Imagine de microscopie optică de transmisie (original).

spre ramificarea reală a filamentului cianobacteriei. Au fost obținute, pe aceeași cale a tratamentului cu NTG, celulele mutante de pigmentație – galbene (**yel**) care alternează cu celulele vegetative normale. Interesant apare faptul că alături de modificări morfologice induse în unele celule ale filamentului de *Plectonema boryanum*, în celulele vecine apar mutante ale citodiferențierii de necrociste (necridii) în care este indusă apoptoză, ceea ce denotă asincronia în replicarea ADN, de la o celulă la alta, a aceluiași filament. Afirmația se bazează pe faptul că NTG acționează la nivelul bifurcației de replicare și, atunci când se aplică mutagenul (NTG), acesta va surprinde într-o celulă o anumită genă aflată la nivelul bifurcației de replicare și va induce mutații în ea, pe când într-o altă celulă a aceluiași filament, bifurcația de replicare se află la nivelul altei gene, (celulele filamentului neavând sincronizată sinteza ADN) și mutagenul va induce frecvența cea mai mare de mutații în această altă genă, aflată la nivelul bifurcației de replicare.

Investigațiile efectuate asupra cianobacteriilor din genul *Phormidium* au evidențiat procesul de clivare a nucleoidului înainte de desfășurarea septării,

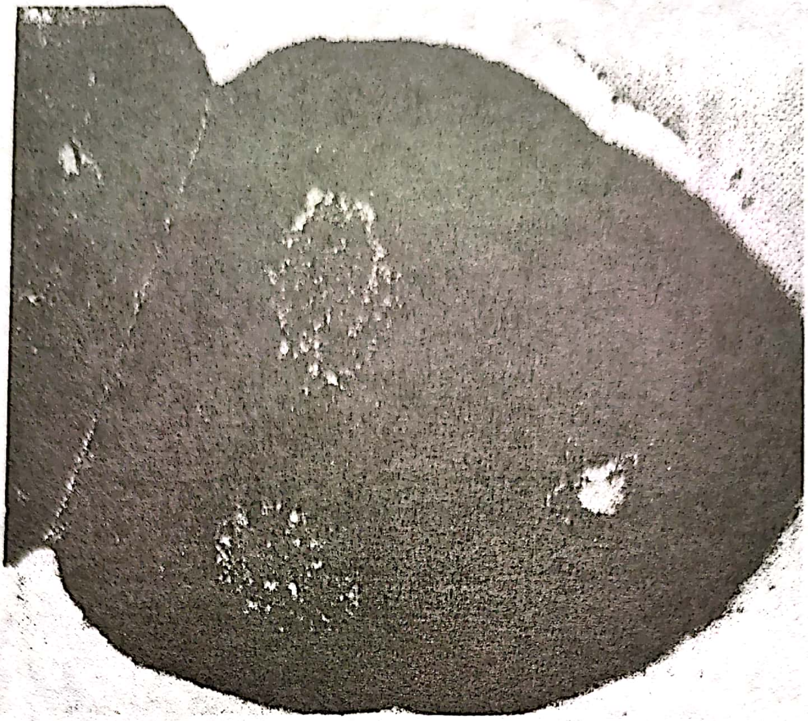


Fig. 11 — Diviziunea celulară normală la *Phormidium* sp. cu formarea septului de diviziune (original).

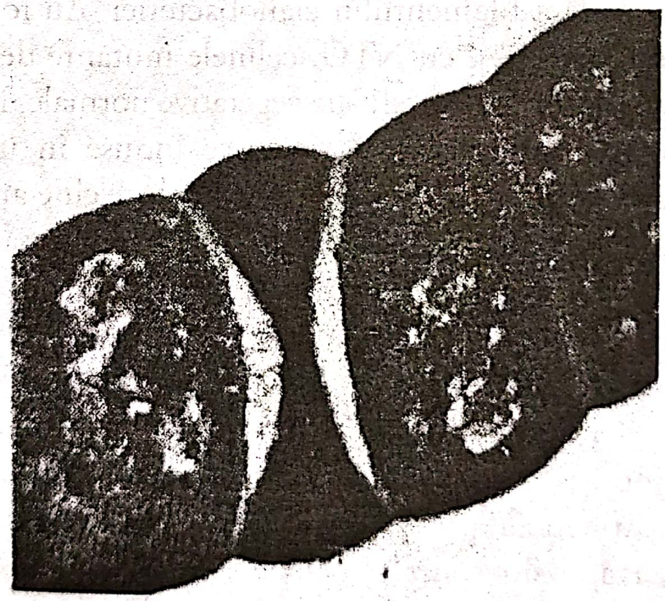


Fig. 12 — Imagine la microscopul electronic cu transmisie. Filament de *Phormidium* sp. – mutante de citodiferențiere, celula din mijloc cu morfologie atipică a fost surprinsă de acțiunea NTG la nivelul complexului genic implicat în controlul diviziunii celulare (original).

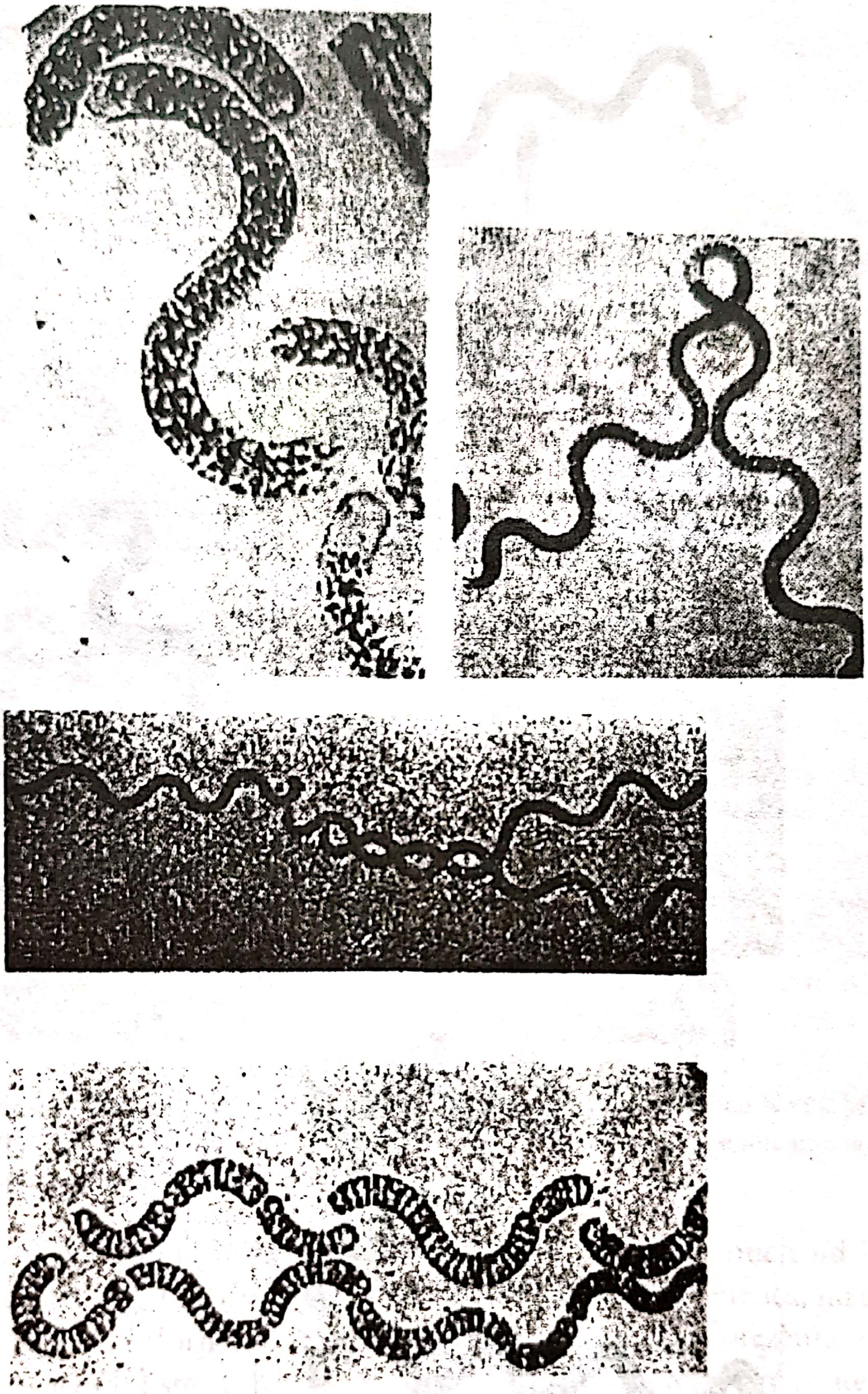


Fig. 13 — *Spirulina platensis*: mutante apărute în urma tratamentului cu NTG: mutanta *„blană de tigru“* și de depigmentare terminală (stânga, sus); mutanta de depigmentare intercalară (dreapta, sus); mutantă *cco* (*„circular covalent open“*) (mijloc) și mutantă de hiperfragmentare (jos). (original, Gavrilă și Maniu, 1985).

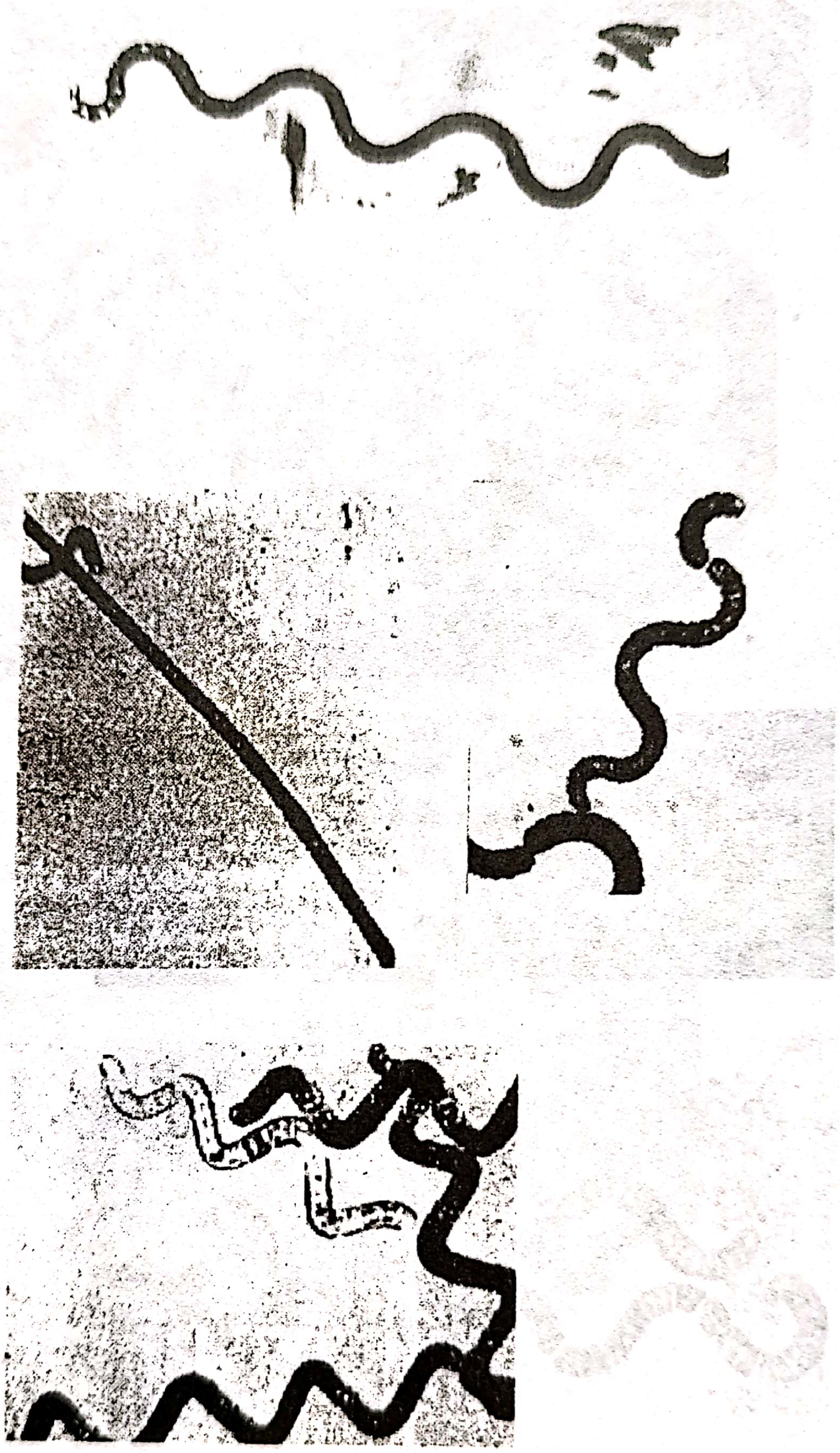


Fig. 14 — *Spirulina platensis*: tipul normal (sus), mutanta „*des*", de despiralizare (mijloc, stânga), mutantă de hiperfragmentare (mijloc, dreapta); mutanta *yel* (jos) (original, Gavrilă și Maniu, 1985).

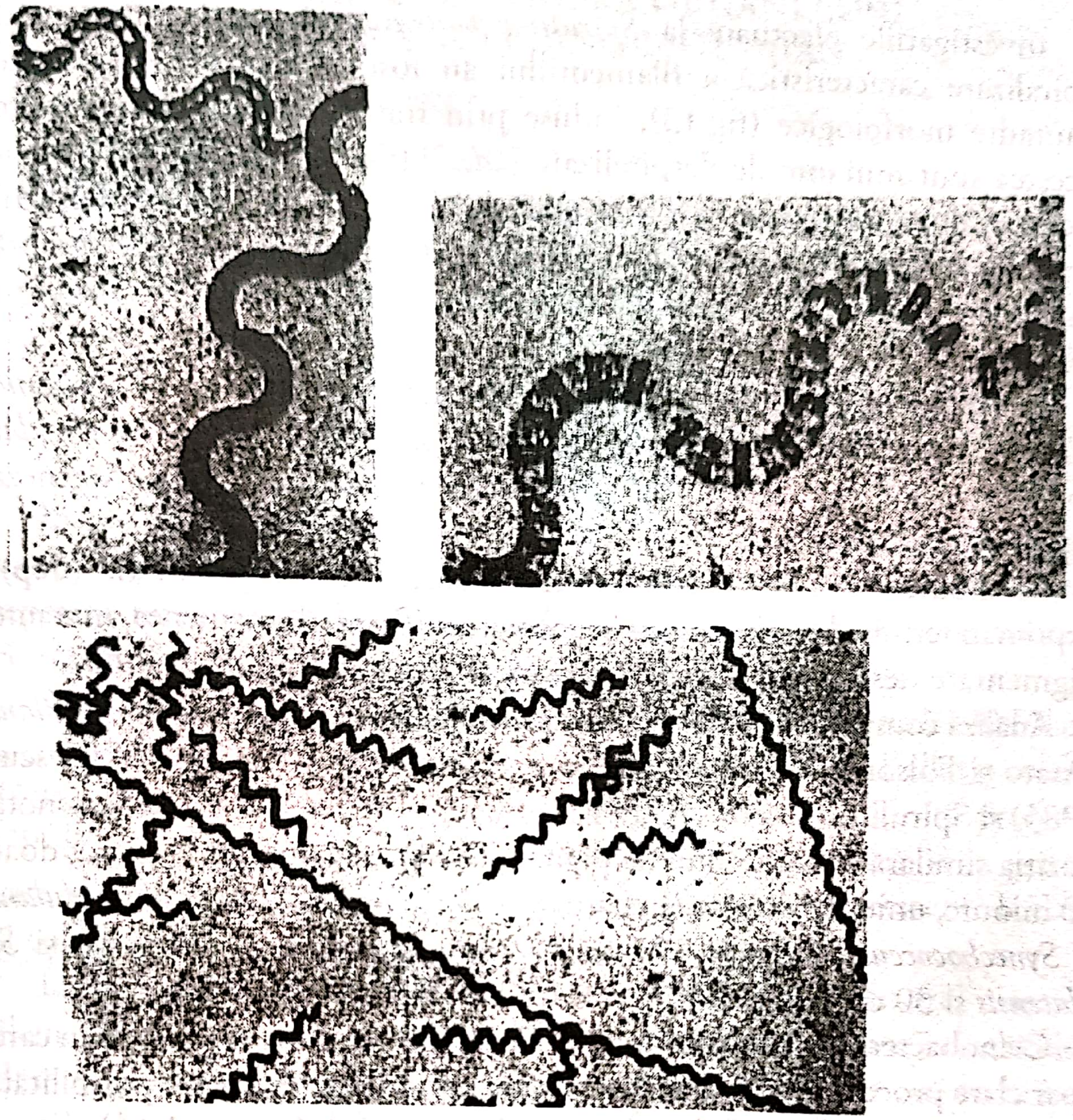


Fig. 15 — *Spirulina platensis*: mutante apărute în urma tratamentului cu NTG. Mutanta *p-yel (partial yellow)* (stânga, sus); mutanta *„zeb“ („zebră“)* (sus, dreapta) și mutanta *superlong* (jos) (original, Gavrilă și Maniu, 1985).

precum și existența posibilă a mai mult decât un singur nucleoid într-o aceeași celulă (fig. 11), care însă, având aceeași informație genetică, nu aduce nici un surplus informațional față de genomul haploid, reprezentat de un singur nucleoid. Este vorba aici de o redundanță cantitativă care poate însă, prin acumulare diferențiată de mutații, să conducă la diversificarea genotipică ce stă la baza plasticității ecologice a cianobacteriilor precum și a evoluției lor. Sub acțiunea NTG, apar procese aberante de citodiferențiere la *Phormidium* (vezi fig.12), cu apariția de celule „sinucigașe“.

Investigațiile efectuate la *Spirulina platensis*, o cianobacterie cu o spiralizare caracteristică a filamentului au fost identificate numeroase mutante morfologice (fig.13), induse prin tratament cu NTG. Printre acestea sunt mutante de despiralizare (*„des"*) (fig.14) care au fost identificate în două momente ale experimentului (20 și 90 de minute) ale hărții genetice temporale, ceea ce se poate interpreta în termenii de redundanță informațională a genei implicată în spiralizarea filamentului de *Spirulina platensis*.

În același moment 60 al tentativei de hartă genetică de la *Spirulina platensis* au mai fost identificate și mutantele *„superlong"* și ***ccv*** (de la *circular covalent closed*) și aici se află prezumtivele gene pentru morfogeneza septumului de diviziune.

La momentul 120 au fost cartați markerii de depigmentație (**dep**), exprimați terminal sau intercalat. Au fost identificate, de asemenea, mutante pigmentare desemnate **yel, zeb**, și **ms-yel**, cartate în momentul 60.

Analiza comparativă a hărților genetice temporale, de la *Anacystis nidulans* (Asato și Folsome, 1970) și *Synechococcus elongatus* (Gavrilă și Mihăescu, 1985) și Spirulina platensis (Gavrilă și Maniu, 1985; Maniu, 1985) denotă poziția similară a markerului de pigmentație **yel**, acesta fiind separat doar 20 minute, unități de cartare în harta genetică temporală, *Anacystis nidulans* și *Synechococcus elongatus*, 10 minute între *Synechococcus elongatus* și *S. platensis* și 30 de minute între *S. platensis* și *Anacystis nidulans*.

Cianobacteriile constituie un grup interesant de microorganisme în care apar clare procese de citodiferențiere și apoptoză, oferind vaste posibilități de investigare în domeniul mutagenezei și organizării genomice.

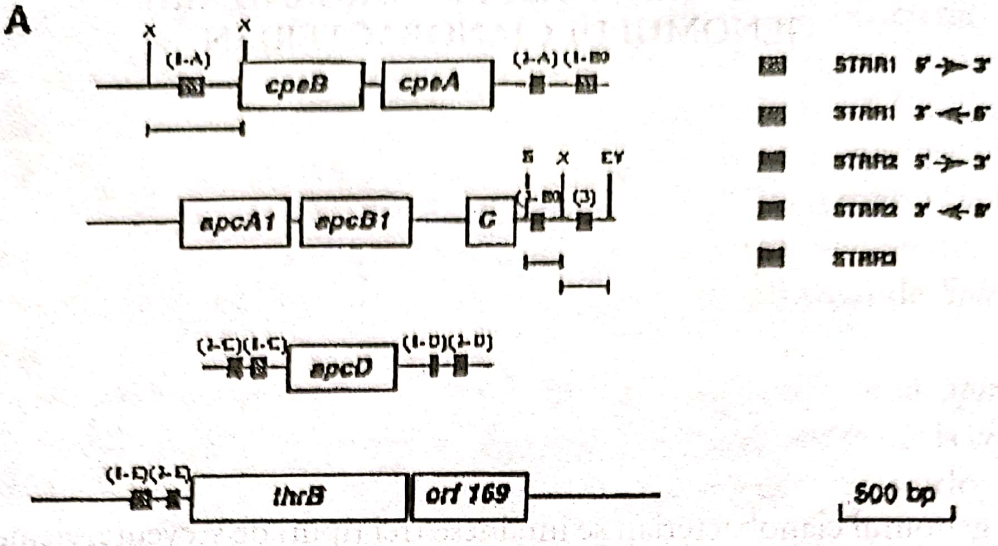
CAPITOLUL XIX

DATE RECENTE ASUPRA ORGANIZĂRII GENOMULUI CIANOBACTERIAN

În genomul cianobacterian se întâlnesc trei tipuri de secvențe: elemente scurte, repetate direct (SDR) (**short direct repeats**), elemente moderat repetate, reprezentate de situsurile de fixare a Tn și elemente înalt repetate cu repetiții scurte, repetate în tandem – STRR.

SDR-uri au fost identificate în gena ferodoxinei la **Anabaena 7120** (Alam și colab,. 1986), gena pentru citocrom *f*, de la **Nostoc 7906** (Kallas și colab., 1988), gena proteinei de legare a clorofilei la PS II, denumită proteina CP-47, de la **Anabaena** (Lang și Haselkorn, 1989), precum și în genele care codifică pentru subunitățile α, γ, δ și F_0 ale ATP- sintetazei (McCarn și colab., 1988).

La **Calothrix PCC 7601** au fost identificate cel puțin trei clase de elemente mici repetate în tandem (STRR), fiecare având câte 7 nucleotide desemnate STRR1–3 (fig. 1). STRR1 și STRR2 se întâlnesc în 100 de còpii (Mazel și colab., 1990). Au fost identificate și secvențe palindromice de tip STRR, despre care se consideră a fi situsuri de legare a girazelor sau sunt implicate în stabilizarea ARNm. Interesant apare faptul că doar cianobacteriile cu heterociști posedă STRR (tabel 1). Rearanjamentele genomice ce însoțesc transformarea celulei vegetative în heterocist au fost evidențiate la **Anabaena PCC 7120**, secvența de nucleotide a regiunilor implicate în acest proces fiind complet diferită de STRR (Golden, 1988).



B

1-A: TATTTATTCCCATC ACCCAAT CCCCAAT CCCCAGT CCCCATT A CCCCTTA TCCCAGA GGGGC CCCGAGT T CCCCAAT CCCCATT A CCCCTTA TCCCAGA GGGTC CCCGAGT T CCCCAGT CCCCAGT CCCCAAT CCTGACTGG.....138 nt ....cpcb
1-b: cpcA.... 410 nt .... GGAGTT CTCCAAT CCCCAAT CCCCAGT CCCCAAT CCCCATT CCCCATT CCCCATT CCCCTCAAACTAAAGAAZ
1-C: TTTTTCCAAAT CCCCAAT CCCTAGT CCCCAAT CCCTAGT CCCCAAT CCCTAAT CATTTCAATTC .... 85 nt .... ApcD
1-D: TTCCTCTGCTT CCCCAGT CCCCAGT CCCCAGT CCCCACC CATAAAAGTT .... 160 nt .... ApcD
1-E: thrB .... 160 nt .... AGGTTTTGTATTTTCCTTT CCCCTTT CACCTTT TCCCCTT CCCCTTT CACCTTT CCCCTTTT CCCCA CCCCTAT GCGATCGCGCA

2-A: cpcA . . . 110 nt .... CTGGTTTGT TTTGTTA TTGGTCA TTGGTCA TTTGTCA TTGGTCA TTTGTCA TTAGTTA TTGGTAA TTCATATCAA
2-B: apcA .... 60 nt . . . TTTTTGTTG TTTGTCA TTTGTCA TTGGTCA TTTGTCA TTAGTCC TTTGCTCA TTCAAACCGAGTT
2-C: CCAATTTGTA TTAGTCA TTTGTTA TTAGCTCA TTTGTCA TTTGCTCA TTTGGGG TTTGCAA TTGGTAA TAGGAGGAATT .... 185 nt .... ApcD
2-D: ATGGGGTAA TTGGTAA TTGGTAA TTGGTAA TTGGTAA TTGGTAA TTGGTAA TTGGTAA TTGGTAA TTGGTAA TTGGTAA TAGATT .... 240 nt .... Apcd
2-E: thrB .... 30 nt .... TCCCATGTCA TTTGTCA TTTGTCA TTGGTTA TTGGTTA TTGGTCA TTTGTCA TTTGGGGT TTGGTAA TTGACCTCAACTC

3: apcC .... 250 nt .... TTTTAAGTCTGT GAACAGT CAACAGT CAACAGT CAACAGT TAACAGT TGAAAGGACA CAGCAGT GCTATGTCCTTT

Fig. 1 — Localizarea și orientarea secvențelor STRR (**S**hort **T**andemly **R**epeat **R**epetitive) la cianobacteria *Calothrix PCC 7601*. A = dispunerea schematizată față de diferite gene (cpeA, B; apcA1, B1, D; thrB) și secvența de nucleotide a acestora (B). Pătratele mici și înnegrite ca și cele hașurate reprezintă STRR. Enzimele de restricție sunt abreviate astfel: EV = EcoRV; S = StuI; X = XbaI (după Mazel și colab., 1990).

STRR joacă rol definit în condensarea, distribuția și replicarea cromozomului, în timpul diferențierii heterocistului. STRR-urile sunt utilizate în taxonomia moleculară, în vederea elucidării rearanjamentelor genomice din procesul de diferențiere a heterociștilor, akineților și hormogoanelor.

Genele cianobacteriilor (tabel 2) sunt organizate în operoni. **Synechococcus PCC 6301** are un genom de 2,7 Mb și conține aproximativ 49 de operoni. Genele pentru ARNr sunt dispuse în două regiuni invers repetate (IR) separate de un spațiator de 600 Kb, ceea ce este comparabil cu organizarea genelor ribozomale din genomul cloroplastic (Kaneko și colab., 1996).

Tabel 1. Distribuția elementelor STRR (Short Tandemly Repeated Sequences) în genomul diferitelor cianobacterii, comparativ cu unele bacterii (după D. Mazel și colab., 1990)

Genul/Specia	PCC Cod	Morfologia cinaobact.	Mol% G+C	Hibridizare cu		
				STRR 1	STRR 2	STRR 3
Synechococcus	6301	u	51.1	-	-	-
	7942	u	ND			
Microcystis	7806	u	ND	-	-	-
Pseudanabaena	6406	f	52.2	+	-	-
	6802	±u	45.9	-	-	-
	6901	f	45.9	-	-	-
	6903	f	45.9	-	-	-
	7367	f	47.7	-	-	-
	7402	f	46.6	-	-	-
	7409	f	43.6	-	-	-
	7429	f	43.8	-	-	-
	7955	f	ND	-	-	-
Anabaena	6411	fh	42.9	++	-	+
	7120	fh	42.5	++	-	+
Nostoc	6705	fh	43.4	++	-	++
	6719	fh	43.9	++	-	++
	6720	fh	41.8	-	+	-
	73101	fh	46.7	+	+	-
	73102	fh	45.2	++	++	+
	7413	fh	42.7	++	++	-
	8009	fh	ND	+++	+++	-
Fischerella	7521	fh	42.3	++	++	-
Calothrix	7504	fh	41.5	+++	+++	+++
	7601	fh	41.5	+++	+++	+++
B. subtilis		u	42	-	-	-
E. coli		u	51	-	-	-

Tabel 2. Genele izolate, clonate și secvențiate din genomul cianobacteriilor (după K Priya Sethu și colab., 1996)

Gena	Codificând	Din cianobacteria
rbcL	Subunit. mare (*large*) din ribulozo-bifosfat-carboxilaza	Anabaena 7120 Chlorogloeopsis 6912 Spirulina & Synechococcus 630
rbcS	Subunit. mică (*small*) din ribulozo-bifosfat-carboxilaza	Anabaena 7120 Chlorogloeopsis 6912 Spirulina & Synechococcus 6301 și 7002
psbA3	Lipoproteina P700	Synechococcus 7002
psbA	Precursor proteina Q_B	Anabaena 7120 Calothrix Synechococcus 7942
psbB	proteina CP-47	Synechocystis 6803 Synechococcus 7942
petF	Ferdoxina	Anabaena 7210 Synechococcus 7942
ppc	Fenolpiruvatcarboxilaza	Synechococcus 6301
trxA trxB	Tioredoxina	Anabaena 7120
atp	Proteinele din ATP-sintetaza	Synechococcus 6301
atpA	Subunitatea β din ATP-sintetaza	Anabaena 7120
atpB	Subunitatea ϵ din ATP-sintetaza	Anabaena 7120
cpcA	Subunitatea α din C-ficocianina	Anabaena 7210 Synechococcus 7002 Calothrix 7601 Synechococcus 7942
cpcB	Subunit. B din C-ficocianina	Anabaena 7120 Synechococcus 7002 Calothrix 7601 Synechococcus 6301 și 7942
cpeA	Subunit.α ficoeritrina	Calothrix 7601
cpeB	Subunit. β ficoeritrina	Calothrix 7601
apcA	Subunit. α aloficocianina	Synechococcus 6301

Gena	Codificând	Din cianobacteria
apcB	Subunit. β aloficocianina	Synechococcus 6301
cpcC, D, E	Polipeptide de legătură cu ficobilizomii	Anabaena 7120
lpcA, B, C	Polipeptide de legătură cu ficobilizomii	Calothrix 7601
nifD	Subunit. α dinitrogenaza	Anabaena 7120
nifK	Subunit. β dinitrogenaza	Anabaena 7120
nihH	Nitrogenaza-reductaza	Anabaena 7120
Xis A	Enzime de excizie	Anabaena 7120
glnA	Glutamin sintetaza	Anabaena 7120
nar	Nitrat reductaza	Synechococcus 7942
rrnA, B	23S ARNr 16S ARNr 5S ARNr	Synechococcus 6301 Synechococcus 6301 Synechococcus 6345 și 6301
trnl	ARNT ptr. Ile	Synechococcus 6345 și 6301
trnA	ARNt ptr. Ala	Synechococcus 6345 și 6301
tufA	Factorul de elongare Tu	Spirulina
fus	Factorul de elongare G	Spirulina
tsf	Factor de elongare TS	Spirulina
rps12	Prot. ribozomale S12	Spirulina
rps7	Prot. ribozomale S7	Spirulina
rps2	Prot. ribozomale S2	Spirulina
gvpA, B, C	Prot. ptr. vacuole gaz	Calothrix 7601
recA	Prot. recA	Anabaena 7120 Synechococcus 7002 Synechocystis 6308
arg		Synechococcus 7002
leu		Synechococcus 7002
met		Synechococcus 7942
thi1		Synechococcus 7942

ATP – sintetaza este implicată în reîncărcarea celulei cu energie eliberată prin respirație celulară și înmagazinarea acesteia în ATP. Ea are localizare transmembranară tilacoidală. Apoproteina este alcătuită din două regiuni, una extrinsecă, notată F_1, compusă din subunitățile α, β, γ și ϵ și alta intrinsecă, notată F_0. La **Anabaena PCC 7120** există un cluster de gene pentru ATP sintetază care a fost simbolizat ***ATP I***, alcătuit din patru gene pentru F_0 și 2 gene pentru F_1, codificând subunitățile *a* (**atp I**), *c* (**atp H**), *b'* (**atp G**), *b* (**atp F**), δ (**atp A**) și γ (**atp c**) (fig. 2). În apropierea genelor pentru ATP – sintetază se află un ORF numit ***gena 1*** echivalentă cu gena *unc I* din cromozomul bacteriei **Escherichia coli**. Clusterul de gene ***atp I*** se află la aproximativ 10 Kb distanță de clusterul ***atp 2*** care conține gene pentru subunitățile *B* (atp B) și *E* (atp E). Clusterul ***atp I*** este transcris într-un ARNm – policistronic de aproximativ 7 Kb. Genele ***atp*** de la **Anabaena** prezintă un aranjament și funcționare mult mai apropiate de acelea din genomul cloroplastic decât acelea din genomul bacterian.

Există o corelație directă între mărimea genomului și complexitatea morfologică. Tulpiniile de cianobacterii producătoare de heterociști au genomuri de dimensiune mai mare față de cele care nu produc heterociști. Astfel, genomul de **Anabaena variabilis ATCC 29413** are 6,4 Mb, pe când cel de **Synechococcus 6301** are doar 2,7 Mb. La **A. variabilis ATCC 29413**, în celulele vegetative, se exprimă aproximativ 65% din genom, pe când în heterocist se exprimă doar 45% din genom. Dintre cele 1000 de gene transcrise și traduse în proteine, numai 600 sunt specifice funcționării heterocistului, multe dintre ele fiind însă amplificate.

Dacă la bacteria fixatoare de azot **Klebsiella pneumoniae** sunt 17 gene ce intră în alcătuirea operonului nitrogenazei, implicat în fixarea azotului (Kenedy, 1977), la **Anabaena**, asemenea gene sunt mult mai numeroase. Astfel, dintre cele 1900 de tipuri distincte de ARNm, de la această cianobacterie, aproximativ jumătate sunt transcrise doar în heterocist. Factorul alosteric σ din holoenzima ARN polimerază este implicat în transcrierea genelor din heterocist. Gena pentru sinteza acestui factor, desemnată ***sigA***, din **Anabaena PCC 7120**, a fost identificată, clonată, exprimată și inactivată experimental (Brahamsha și Haselkorn, 1992). În genomul acestei cianobacterii au fost identificate și genele înrudite cu **sigA**, care au fost desemnate ***sigB*** și ***sigC9***. Produsul genei **sigA** se prinde în regiunile –10 și –35 din promotorul operonului nitrogenazei, la **Anabaena**, înregistrându-se și o competiție pentru prinderea la aceste situsuri între produșii genici ai celor trei gene ***sig***. În cursul diferențierii heterocistului se înregistrează modificări ale secvenței ADN din vecinătatea operonului ***nif*** (Golden și colab., 1985), printre care, excizia unui segment de 11 Kb, cu formarea unei structuri circulare, precum și deleția, inversia sau transpoziția unui segment de ADN, adiacent operonului **nif**. Lipsa azotului declanșează asemenea modificări specifice heterocistului.

Genele ***nifH***, ***nifD*** și ***nifK*** care dirijeajă sinteza unor subunități ce intră în structura nitrogenazei au fost izolate și secvențiate (Rice și colab., 1982; Mazur și colab., 1982, Lammers și colab., 1982). Genele **nifH** și **nifD** sunt adiacente în cadrul operonului, pe când genele **nifD** și **nifK** sunt separate printr-un spațiator de 11 Kb, care va fi excizat în cursul procesului de diferențiere a heterocistului, procesul de excizie fiind decisiv în activarea operonului. Acest proces amintește de evenimentele care se derulează în activarea genelor pentru imunoglobuline, fără însă a se cunoaște care este rolul specific al acestui spațiator de 11 Kb.

La **Fremyella diplosiphon** a fost identificată o regiune de origine a replicării în plasmidul **pFdA** care, asemănător celei din plasmidul **pDU1**, din **Nostoc PCC 7524**, conține un cadru deschis citirii (ORF) care controlează sinteza unei proteine conservate, dar cu funcție necunoscută (Schafer și colab., 1993; Reaston și colab., 1982; Cobley și colab., 1993).

În figura 3 se prezintă harta de restricție pentru plasmidul cianobacterian pUH24, izolată din **Anacystis nidulans R2** (**Synechococcus PCC 7942**)

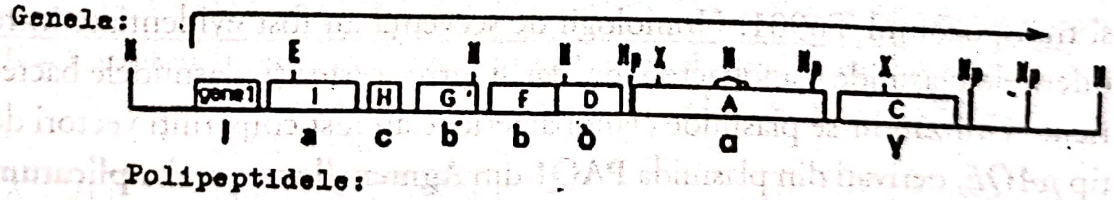


Fig. 2 — Harta fizică și de restricție a regiunii *atpI* din genomul cianobacteriei **Anabaena PCC 7120**, regiune ce codifică subunități ale ATP-sintetazei. Zonele dreptunghiulare reprezintă genele, iar imediat sub acestea sunt litere corespunzătoare tipului de polipeptide ce le codifică aceste gene. Regiunile codificatoare pentru *atpF* și *atpD* sunt suprapuse, iar gena *atpI* este transcrisă într-un ARNm policistronic ce este sintetizat cu 140pb în amonte de gena „gene 1". Abrevierile pentru situsurile enzimelor de restricție sunt X = XbaI; Hp. = HpaI; H = HindIII; E = EcoRI (după McCarn și colab., 1988).

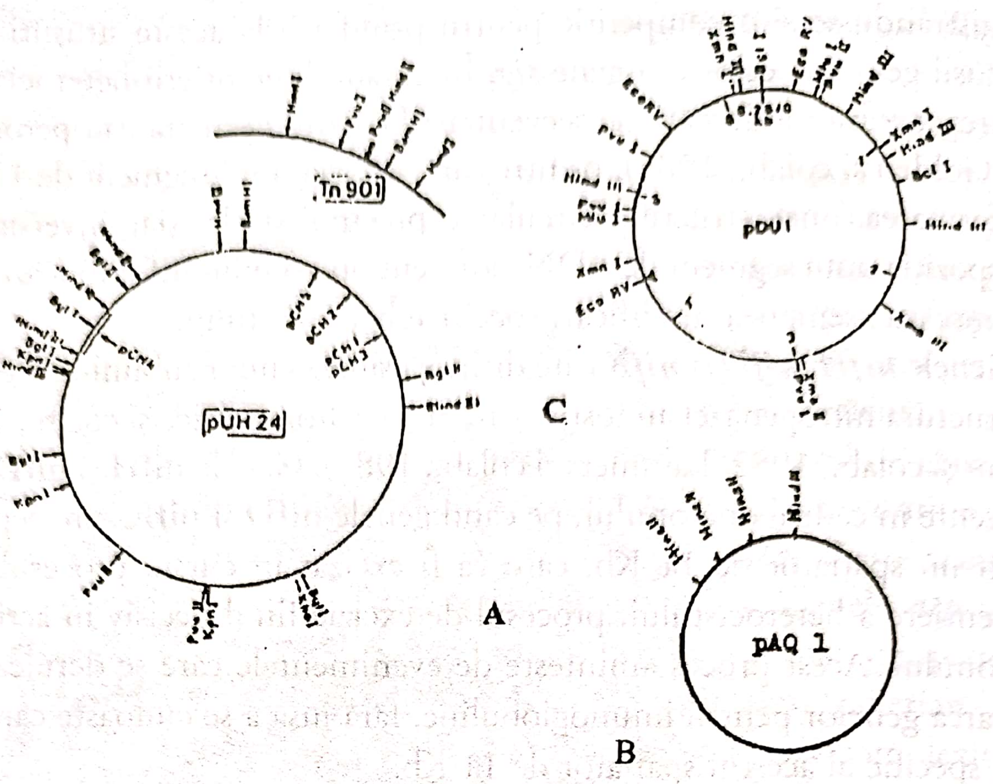


Fig. 3 A — Harta de restricție pentru plasmidul cianobacterian pUH24, izolată din **Anacystis nidulans R2 (Synechococcus PCC 7942)** și transpozonul Tn 901 (bla; AMP^{R}). Săgețile din interiorul cercului marchează locurile de inserție a Tn901 precum și denumirea plasmidelor rezultate din acest proces (pCH+5) (după Van den Hondel și colab., 1980) B = Harta de restricție pentru plasmidul indigen pAQ1 din **Agmenellum quadruplicatum PCC 7002)** (după Buzby și colab., 1985).
C = Harta de restricție a plasmidului pDU1 izolat din **Nostoc PCC 7524** (Wolk și colab., 1984).

și transpozomul Tn901. Homologii de secvență au fost evidențiate între diferitele plasmide cianobacteriene, dar și între acestea și plasmidele bacteriene. Utilizându-se plasmide cianobacteriene au fost construiți vectori de tip *pAQE*, derivați din plasmida **PAQ1** din **Agmenellum quodruplicatum PR6 – Synechococcus PCC 7002** (Buzby și colab., 1985) (fig. 3B).

Virusurile cianobacteriilor, descoperite în anul 1963 și denumite cianofagi ar trebui să fie numiți, de fapt, *cianobacteriofagi*. Ei sunt similari ca structură și evoluție cu bacteriofagii, atacând o gamă largă de cianobacterii (Zarnea, 1983). Ei conțin ADN dublucatenar și au un genom variabil ca dimensiune, între 24 și 57 Mda, având un ciclu de reproducere care durează aproximativ 15 ore. Cianobacteriofagul A-4 are un ciclu de reproducere foarte scurt, de numai 2,5 ore. Cei mai cunoscuți cianobacteriofagi sunt LPP-1 (acronim derivat de la **Lyngbya – Plectonema – Phormidium**), N-1 (de la **Nostoc** și **Anabaena**) și AS-1 (de la **Anacystis nidulans**). Virionul N-1 are un cap poliedral, cu un $\Phi = 550$Å, coadă contractilă de 1100Å, un genom ADN dublucatenar, linear, cu o densitate de $1,69 g/cm^3$ și un coeficient de sedimentare de 38,3S. Valoarea conținutului G+C este de 37%. Greutatea moleculară are 38×10^6 Da. Au fost identificate 19 proteine specifice acestui cianobacteriofag. Caracteristicile principale ale cianobacteriofagilor identificatți până în prezent sunt redate în tabelul nr. 3.

Tabelul 3. Caracteristicile cianobacteriofagilor (după Pelezer, 1977; Dzelezkalns, 1989)

Cianofagul	Gazda	Morfologie	Genom
LPP – 1 LPP – 2 virulenți	Lyngbya Plectonema Phormidium	Cap hexagonal Φ=60 + 2nm Coada scurtă și necontractilă 20X15nm	ADNdc 13,2μm lung. 27Md
SM – 1 virulent	Synechococcus Microcystis	Cap icosaedric Φ =67 X 1,8nm. Coada f. scurtă Guler cu fibre fine	ADNdc
AS – 1 AS – 1M virulenți	Synechococcus PCC 6301	Cap hexagonal Φ = 90nm Coada f. lungă 243X22nm.	ADNdc 57Mda
S – 2(L) virulent	Synechococcus PCC 6907		ADNdc 28 Mda *A* înlocuită de Amino-adenina
N – 1 virulent	Nostoc muscorum Anabaena variabilis PCC 7120	Cap hexagonal Coada lungă și contractilă 110X16nm	ADNdc 30MDa
A – 4(L) temperat	Anabaena variabilis PCC 7120		ADNdc 24 Mda Ciclu f. scurt = 2,5h

Cianofagul N-1 poate liza celulele fotosintetizante, nu însă și heterociștii de **Nostoc**. Același fenomen este remarcat și la cianobacteriofagii de la **Cylinospermum** și **Anabaena raciborskii**. Cianobacteriofagul N-1 poate fi menținut în cultură și pe alte cianobacterii, precum **Anabaena 7120** (Currier și Wolk, 1979).

Cei mai mulți cianobacteriofagi sunt virulenți (litici), puțini având și un ciclu lizogen (de exemplu, la **Anabaena**).

Studiul interacției cianobacterii fotosintetizante – cianobacteriofagi este orientat spre descifrarea mecanismelor de control redox al unor căi metabolice, a mecanismelor care generează ATP, precum și a mecanismelor de reparare a leziunilor din ADN. La cianobacterii au fost identificate secvențe de inserție (IS) cu repetiții terminale inversate de aproximativ 10 nucleotide care formează un duplex cu ADN de inserție de 2–12 pb. Aceste IS-uri au aproximativ 2,6 Kb și conțin unul sau mai multe ORF-uri. La **Calothrix PCC 7601** s-a descris IS 701, care are 1,4 Kb (Mazel și colab., 1988). Asemenea IS-uri s-au descris și la **Anabaena 7120** și la **Anabaena M-13**. Plasmidele acestor cianobacterii de 410 Kb, respectiv de 115 Kb conțin, la rândul lor, IS-uri.

Transpozonii (Tn), adică secvențe specifice de ADN care au proprietatea transpoziției dar, în plus, exprimă și alte trăsături fenotipice, separate de funcția de transpoziție, au fost descriși la **Anacystis nidulans R-2**. Hondel și colaboratorii (1979) au demonstrat capacitatea transpozonului Tn 901, din plasmida pR146, de la bacteria **Escherichia coli**, purtător al genei pentru β-lactamază (Ap’), de a se integra (de a transpoza) în genomul cianobacteriei **Anacystis nidulans R-2**. Se consideră că, în acest caz, are loc transferul genei ***bla*** din Tn 901 în plasmidele cianobacteriene criptice de tip pUH24, generând variante plasmidice noi (pCH1–pCH5). Identificarea acestor plasmide care posedă gena ***bla*** poate fi realizată prin selecția transformanților la ampicilină (Ap’).

Genomul cianobacteriei unicelulare Synechocystis PCC 6803 a fost descifrat integral, în anul 1996. El este reprezentat de o moleculă circulară de ADN dublu-catenar (fig. 4). Descifrarea s-a realizat prin studiul bibliotecilor genomice din 107 cosmide, 15 clone din fagi lambda și 17 produși PCR. După secvențierea acestora și identificarea genelor și ORF-urilor, prin comparație cu băncile de gene existente, datele obținute au fost reunite pe suportul hărții fizice.

Genomul de **Synechocystis PCC 6803** are 3.573.470pb, cu o medie a conținutului GC de 47% (Kaneko și colab., 1996). În genomul acestei cianobacterii se întâlnesc două tipuri de secvențe repetitive, unul

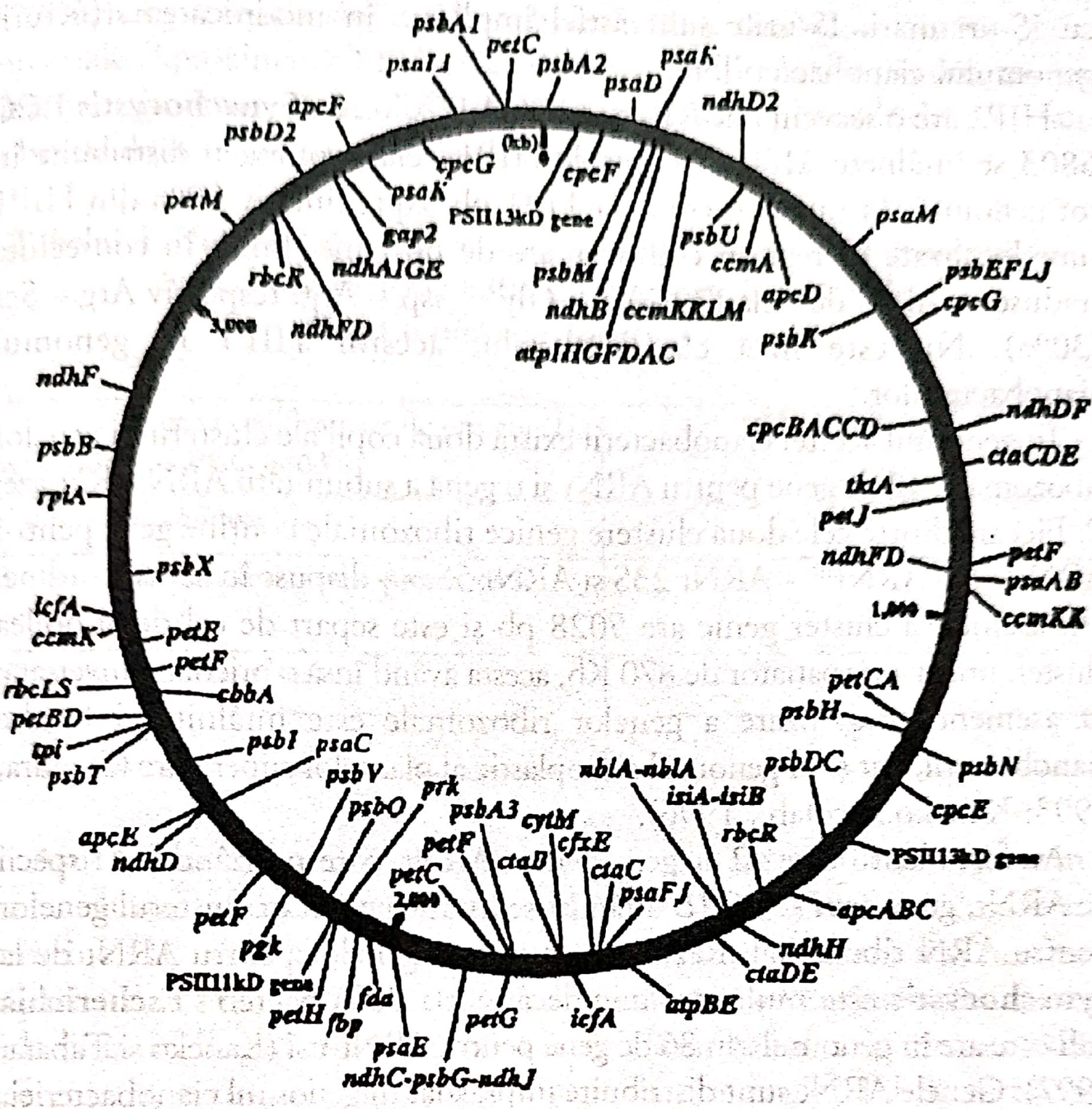

psbA1
petC
psaIJ
psbA2
psaK
psaD
apcF
ndhD2
psbD2
(kb)
0
cpcG
cpcF
psaK
PSII13kD gene
petM
gap2
psbU
psaM
ndhAIGE
ccmA
rbcR
psbM
psbEFLJ
apcD
cpcG
3,000
ndhFD
ndhB
ccmKKLM
psbK
atpIIIGFDAC
ndhF
cpcBACCD
ndhDF
psbB
ctaCDE
tktA
rpiA
petJ
psbX
ndhFD
petF
psaAB
icfA
1,000
ccmKK
ccmK
petE
petF
rbcLS
cbbA
petCA
petBD
psbH
tpi
psbI
psaC
psbT
psbV
nblA-nblA
psbDC
psbN
prk
psbO
isiA-isiB
cpcE
psbA3
cytM
apcE
rbcR
ndhD
petF
cfxE
PSII13kD gene
ctaB
ctaC
petC
psaFJ
2,000
apcABC
petF
pgk
ndhH
ctaDE
PSII11kD gene
fda
atpBE
petH
fbp
petG
icfA
psaE
ndhC-psbG-ndhJ

Fig. 4 — Harta fizică a genomului la cianobacteria **Synechocystis PCC 6803** (35573470) şi localizarea câtorva gene (după Kaneko şi colab., 1996).

asemănător IS-urilor şi un element HIP1, acronim derivat de la *Highly Iterated Palindromic Sequences*. Peste 70 de elemente ***IS-like*** au fost identificate în acest genom, conţinând ORF-uri cu similitudini cu secvenţele de codificare a transpozazei la Tn şi IS de la bacterii. Secvenţele invers repetate de la capete au 17–36pb şi pe baza lor s-au stabilit nouă grupe de IS-uri ale acestei cianobacterii. Doar 26 ORF-uri păstrează întreaga capacitate de codificare a transpozazei, restul fiind alterate prin mutaţie de tip *frameshift*. Între IS-uri aflate în diferite poziţii în genom se poate realiza recombinare omoloagă care conduce la realizarea unor sectoare genomice cu IS-uri mari. IS-urile sunt astfel implicate în modificarea structurii genomului cianobacteriilor.

HIP1 are o secvență de 8 baze: GCGATCGC. La **Synechocystis PCC 6803** se întâlnesc 3160 de copii de HIP1, relativ omogen distribuite în tot genomul, în medie o copie la 1131 pb. Aproximativ 90% din HIP1 sunt localizate în regiuni codificatoare de proteine, fiind, în consecință traduse ca Ala – Ile- Ala (70%) sau Gly – Asp – Arg, respectiv Arg – Ser (30%). Nu este încă clarificat rolul acestor HIP1 în genomul cianobacteriilor.

În genomul acestei cianobacterii există două copii ale clusterului genelor ribozomale, 42 de gene pentru ARNt și o genă a subunității ARN a RN-azei P. Fiecare dintre cele două clustere genice ribozomale conține gene pentru ARN 16S – ARNt^{Ile} – ARNr 23S și ARNr 5S, — dispuse în această ordine. Un asemenea cluster genic are 5028 pb și este separt de cel de al doilea cluster, printr-un spațiator de 870 Kb, acesta având însă o orientare inversată. O asemenea organizare a genelor ribozomale este întâlnită și la alte cianobacterii, dar și în genomul cloroplastic al plantelor superioare (Sugiura, 1993; Kaneko și colab., 1996).

Au fost identificate 42 de gene pentru ARNt, corespunzând la 41 specii de ARNt, gena ***trnI — GAU*** aflându-se în două copii în clusterul genelor pentru ARN ribozomal. Rezultă că numărul genelor pentru ARNt de la **Synechocystis** este mult mai mic decât acela de la bacteria **Escherichia coli** care are în genomul său 86 de gene pentru ARNt-uri (Kaneko și Tabata, 1997). Genele ARNt sunt distribuite împrăștiat în genomul cianobacteriei, doar genele ***trnY – GUA*** și trnT . GGU sunt aliniate în tandem, separate de un mic spațiator de numai 8pb. La **E. coli**, genele pentru ARNt se află în clustere de 5–9 (Kamine și colab., 1990).

Pe baza analizei computerizate a secvențelor, s-au identificat 167 de regiuni codificatoare de proteine și 282 de cadre deschise citirii (ORF). Se estimează astfel că există aproximativ 3168 de gene potențial codificatoare de proteine, cu o densitate genică de 1 genă/ 1,1 Kb. Lungimea medie a proteinelor este de 326 aminoacizi. Regiunile genomice codificatoare de proteine reprezintă 87% din genom. Dintre cele 3168 de gene estimate a fi codificatoare de proteine, 145 (4,6%) au fost identificate cu gene deja raportate pentru **Synechocystis PCC 6803**, 935 de gene (29,4%) au un grad mare de similitudine cu gene deja cunoscute, iar 324 (10,2%) și 342

(10,8%) au prezentat similitudine cu gene deja cunoscute sau cu gene potențiale. Aproximativ 1424 gene, reprezentând 45% din genom, nu au prezentat similitudine cu nici o secvență existentă în băncile de gene sau în bazele de date pentru proteine (tabelul 4)

Tabelul 4. Numărul de gene codificatoare de proteine din genomul de Synechocystis PCC 6803 și categoriile funcționale (după Kaneko și Tabita, 1997).

Categoria de gene codificatoare de proteine la **Synechocystis PCC 6803**	Numărul de gene
Sinteza unor aminoacizi	84
Biosinteza de cofactori, grupe prostetice și molecule *carrier*	108
Membrană/ perete celular	64
Procese celulare	62

Asociat nucleoidului cianobacterian au fost descrise proteine asemănătoare histonelor eucariotelor (*histone – like*) și care au fost desemnate proteine HU. Aceste proteine au o greutate moleculară mică și prezintă capacitate de legare la ADN, ambele asemenea caracteristici întâlnindu-se și la histone. Bogăția lor cantitativă în celulă și înaltul conservatorism de secvență în aminoacizi apropie și mai mult proteinele HU de histonele eucariotelor.

Proteinele HU se leagă la ADN cromozomal sau plasmidic, **in vitro**, indiferent de secvența de nucleotide a acestuia, situsurile de legare fiind la fiecare 270–290pb (Broyles și Pettijohn, 1986; Rouviere-Yaniv și colab., 1979), generând configurații **nucleosome-like**.

Proteina IHF (de la, **Integration Host Factor**) este asemănătoare structural proteinei HU și poate să se lege la ADN, in vitro. Această proteină poate introduce o răsucire topologică negativă a ADN, la nivelul situsului **att**, în asociere cu proteina Int împachetând regiunea cromozomului bacterian ce conține **attP**. Ihf nu este tot atât de abundentă în celulă, precum este HU. Proteine histone-like desemnate HM, H1, HMG etc. au fost identificate și în mitocondriile drojdiilor (**Saccharomyces cerevisiae**), protozoarelor (**Crithidia fasciculata**), umane (**Homo sapiens**) și la mucegaiul **Physariumm polycephalum**, fiind numite ***mitocondriamine***. Drlica și Rouviere-Yaniv (1987) au propus un model pentru structura fibrei genoforale procariote, bazat pe constatarea că la fiecare 290pb se află o moleculă HU (Broyles și Pettijohn, 1986; Rouviere-Yaniv și colab., 1979) și că situsurile hipersensibile la endonucleaze se află la intervale de 58pb, structura repetitivă fiind probabil un tetramer de HU. Modelul este speculativ și inspirat de modelul nucleosomal al fibrei de cromatină eucariote.

Proteinele HU cianobacteriene (fig. 5) au fost izolate de către Haselkorn și Rouviere-Yaniv (1976). Se consideră că aceste proteine mențin cromozomul cianobacterian în stare pliată. Cromozomii izolați din heterociști nu sunt complexați cu proteine HU. Proteina HU de la **Anabaena PCC 7120** este un homodimer cu subunități de câte 94 resturi de aminoacizi, jumătate dintre aceste resturi fiind identice cu cele ale subunităților proteinei HU de la **Escherichia coli**.

Gena pentru proteina HU de **Anabaena PCC 7120** a fost izolată, clonată și secvențiată, având un promotor cu totul diferit de promotorii altor gene ale acestei cianobacterii, fiind o genă de tip stringent, deoarece se află într-un singur exemplar per genom. Gena HU de **Synechocystis PCC 6803** este poziționată în tronsonul dintre perechile de baze 971289 și 97088 pb, având o identitate de 67% față de omoloaga sa de la **Anabaena**, produsul genei având 135 resturi de aminoacizi. Similitudinile de secvență de aminoacizi între proteinele HU de la diferite procariote sunt prezentate în figura 6.

Ciclul celular al cianobacteriilor este dependent de lumină, fiind astfel diferit de cel al bacteriei **Escherichia coli**. **Synechococcus PCC 6301** conține multiple copii genomice pe parcursul multor generații. Replicarea este inițiată asincron, la nivelul diferitelor copii genomice (Mann și Carr, 1974; Binder și Chischoln, 1990). Secvența ***dnaA*** a fost clonată (Richter și Messer, 1995), constatându-se o omologie de 45% cu gena ***dnaA***, de la **Bacillus subtilis**. În aval de gena ***dnaA*** a fost detectat un ORF. Gena ***purT*** care codifică pentru glicinamidă – ribonucleotidtransformilaza T începe cu 200pb mai înainte de acest ORF, în direcție opusă. În aval de ***dnaA*** a fost detectată zona start a operonului ***psbDC*** care codifică proteinele implicate în centrul de reacție D2 și CP43, implicate în poziționarea clorofilei a din cadrul fotosistemului II.

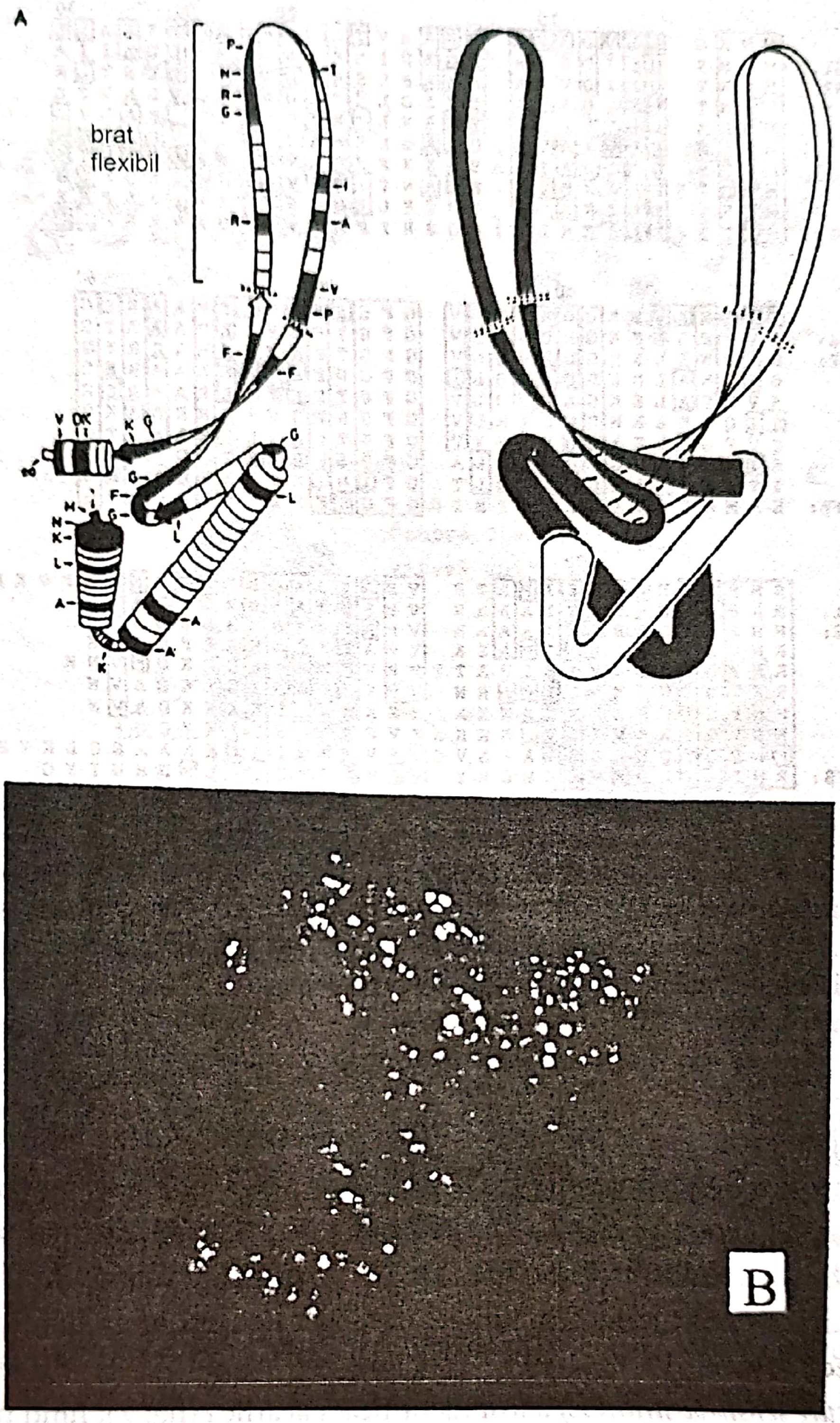


Fig. 5 — Structura schematică (cu riboane) (A.) a proteinei HU (HBs) evidențiată prin cristalografie în raze X, atât la forma monomerică (stânga) cât la forma dimerică (dreapta) și structuta tridimensională, prin reprezentare computerizată (cu bile) (B.) (după Drlica și Rouviere – Yaniv, 1987) .

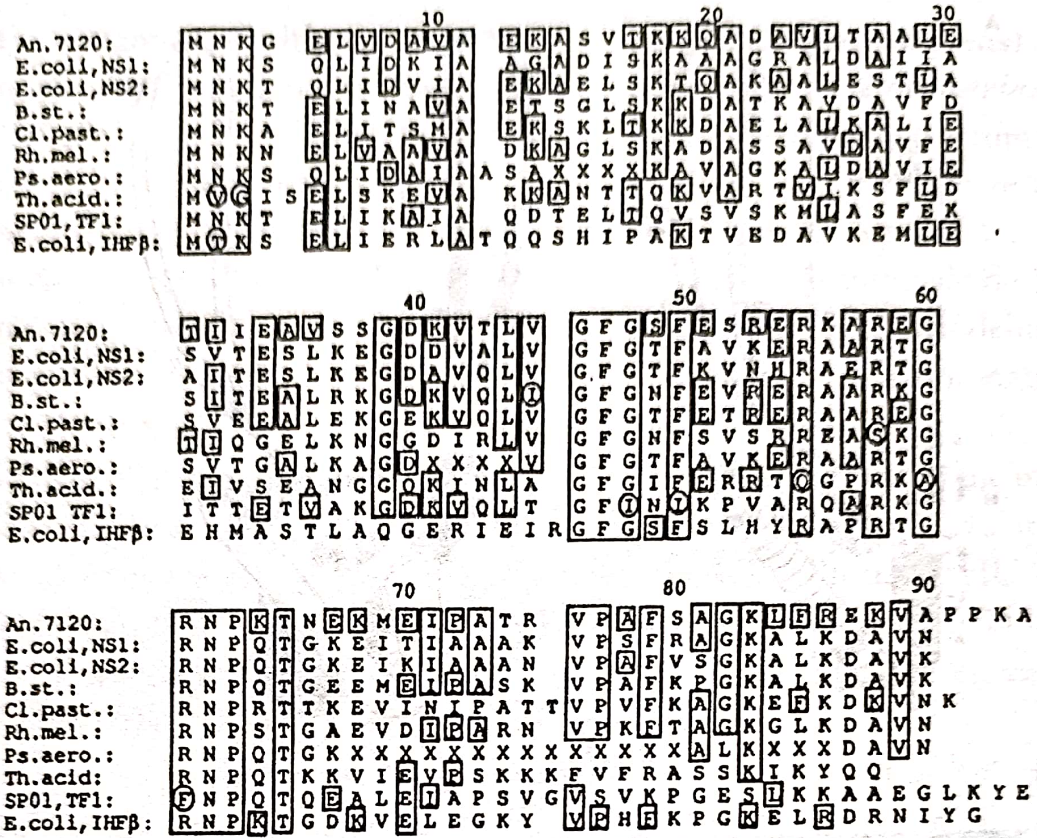


Fig. 6 — Studiu de aliniament între resturile de AA ale proteinei HU cianobacteriene (izolată din **Anabaena sp. PCC 7120** = An. 7120) cu secvențe omoloage de la **E. coli** NS1 și NS2; B. st. = **Bacillus stearothermophylus;** C. past. = **Clostridium pasteurianum;** Rh. mel. = **Rhizobium meliloti;** Ps. aero. = **Pseudomonas aerogenes;** Th. acid = **Thermoplasma acidophylus; E. coli** IHFB = proteina TF1 codificată de fagul SPO1. Resturile de AA omoloage apar sub forma de cutii (după Nagaraja și Haselkorn, 1994).

Aranjamentul genic ***pur T – orfI34 – dnaA – psbDC*** este specific cianobacteriei **Synechocystis PCC 6803** (fig. 7). Gena ***dnaA*** (***arI2009***) este situată în genomul cianobacteriei **Anabaena PCC 7120**, între pozițiile 2403018 – 2404397, proteina DnaA având la aceasta 60 resturi aminoacizi și prezentând o omologie de 63,2% cu proteina omoloagă de la **Synechocystis PCC 6803**. Proteina de ***FtsZ*** (de la *Filamenting temperature sensitive strain Z*) a fost identificată la arhea (fig. 7), fiind produsă în cantități mari în citoplasma celulelor care nu se divid, pentru ca în celulele care se divid, ea să formeze un inel, legat la membrana citoplasmatică internă. Citokineza și septarea decurg sincron, pe măsură ce acest inel de proteine ***FtsZ*** se restrânge, septul de peptidoglicani se formează, iar când septul este

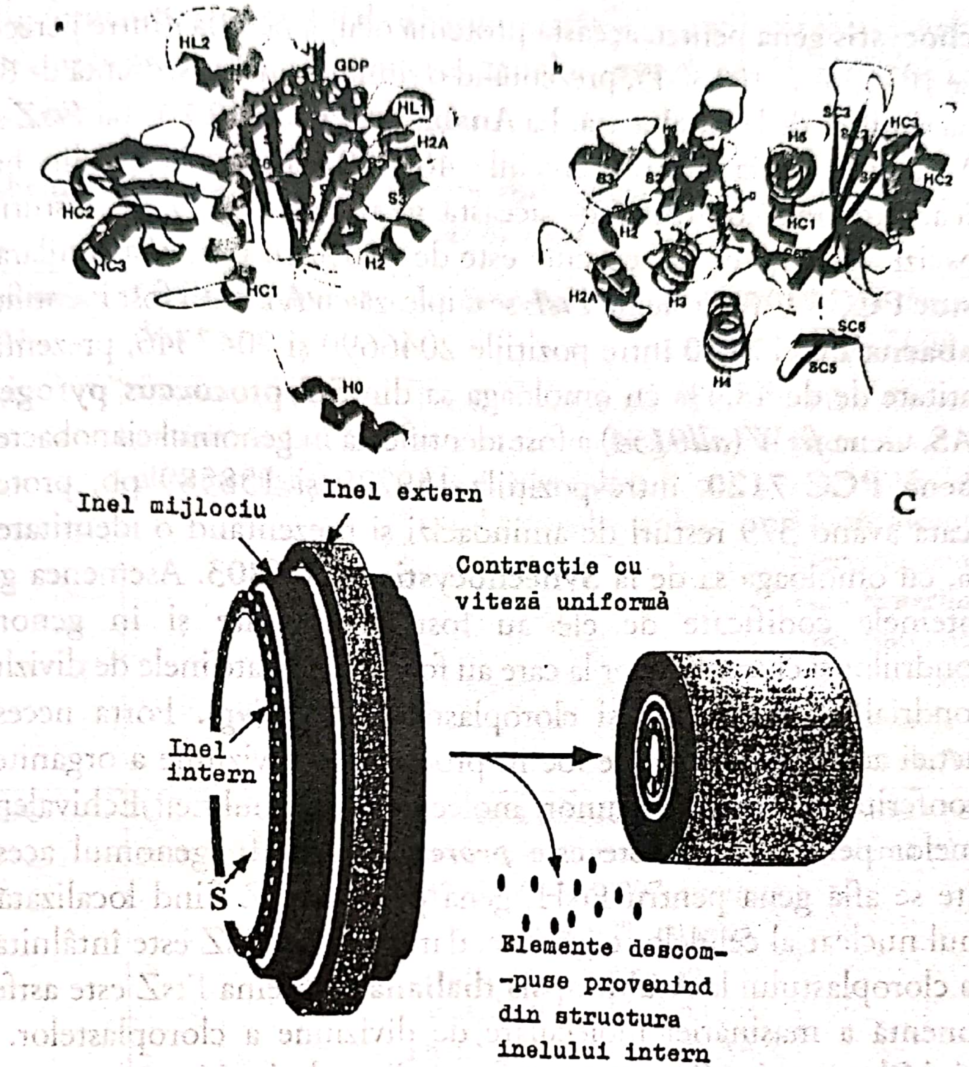

a
HL2
H1
GDP
HL1
H2A
S3
HC2
HC3
HC1
H2
H0
b
H5
SC3
HC3
HC2
B3
HC1
H2
H2A
H3
H4
SC5
SC5
Inel mijlociu
Inel extern
C
Contracţie cu
viteză uniformă
Inel
intern
S
Elemente descom-
-puse provenind
din structura
inelului intern

Fig. 7 — Reprezentare computerizată tridimensională a structurii (cu riboane) proteinei FtsZ, izolată de la **Methanococcus jannaschii.** Este marcată componenta GTP-azică a proteinei, iar zona spre capătul –COOH este marcată prin modelare cu bile şi baghete. Se observă o moleculă de GDP (după Love şi Amos, 1998). C = schema de funcţionare a inelului tristratificat atribuit proteinelor FtsZ şi implicat în diviziunea plastidelor şi mitocondriilor (după Miyagischima şi colab., 1999, din Kuroiwa, 2000).

deja format, inelul ***FtsZ*** dispare. Proteina FtsZ este o proteină de legare pentru GTP/GDP. În stare activată, proteina ***FtsZ*** funcţionează ca o GTPază şi este considerată echivalentul procariotic al tubulinelor eucariote. Împreună cu alte proteine precum FtsA, FtsQ, FtsI (PBP3) FtsW, FtsE etc. proteina FtsZ asigură forţa motrice în diviziunea celulei procariote, la bacterii şi cianobacterii precum **Synechocystis, Nostoc** şi **Anabaena**. La

Synechocystis gena pentru această proteină ocupă poziția dintre perechile de baze 1014337 și 1013045, prezentând o similitudine de secvență de 68% cu gena similară de la **Anabaena**. La **Anabaena PCC 7120**, gena ***FtsZ*** (***arI 3858***) ocupă poziția dintre perechile 4655902 și 4657188, din harta genetică, proteina codificată de această genă având 429 de resturi de aminoacizi. Identitatea de secvență este de 100% cu proteina similară de la **Nostoc PCC 7120**. Proteina ***FtsE*** se cuplează cu ATP și a fost identificată la **Anabaena PCC 7120** între pozițiile 2046690 și 2047346, prezentând o identitate de de 48,4% cu omoloaga sa din **Streptococcus pyrogenes M1GAS**. Gena ***ftsW*** (***all0154***) a fost identificată în genomul cianobacteriei **Anabaena PCC 7120**, între pozițiile 159779 și 158589 pb, proteina codificată având 379 resturi de aminoacizi și prezentând o identitate de 60,2%, cu omoloaga sa de la **Synechocystis PCC6803**. Asemenea gene și proteinele codificate de ele au fost identificate și în genomul mitocondriilor și cloroplastelor la care au fost identificate inele de diviziune mitocondrială (*inelul MD*) și cloroplastică (*PD ring*). Forța necesară contracției acestor inele ce are loc în procesul de diviziune a organitelor este conferită de prezența unor molecule de tubuline. Echivalentul tubulinelor pentru procariote este ***proteina FtsZ***. În genomul acestor organite se află gena pentru FtsH, gena pentru FtsZ fiind localizată în genomul nuclear al celulelor eucariote, dar proteina FtsZ este întâlnită în stroma cloroplastului la **Arabidopsis thaliana**. Proteina FtsZ este astfel o componentă a mașinăriei moleculare de diviziune a cloroplastelor. La mușchiul **Physcomitrella patens** au fost realizate leziuni în secvența genei **ftsZ**, precum și transformarea cu o genă antisens la **Arabidopsis thaliana**, ceea ce s-a asociat cu apariția unui singur cloroplast gigantic, dovadă directă a implicării proteinei FtsZ în diviziunea cloroplastelor.

În genomul cianobacteriei **Synechocystis PCC 6803** au fost identificate gene care dirijează sinteza proteinelor implicate în formarea septum-ului de diviziune. Aceste proteine au fost desemnate ***ftsI*** sau ***pbpB***. Gena este situată între perechile de baze 624123 și 622300, având o identitate de secvență de 53% cu elementul omolog de la **Nostoc PCC 7120**. Această genă codifică pentru o proteină de 607 resturi aminoacizi. Gena pentru proteina ***ftsW*** a fost pusă în evidență în genomul de **Anabaena PCC 7120** și este poziționată între 159779 și 158589 perechi de nucleotide, având o identitate de 60,2% cu omoloaga sa, de la **Synechocystis PCC 6803**, codificând pentru o proteină de 397 resturi aminoacizi.

În formarea septumului de diviziune, atât la bacterii, cât și la cianobacterii sunt implicați și produșii genici ai genelor ***mur A, B, D, E, F, G***, precum și ai genelor ***mraY***. (tabelul 9).

Tabelul 9. Genele implicate în controlul formării septului de diviziune la cianobacterii

Denumire genă	**Codifică proteina denumită:**	**La *Synechocystis PCC 6803***	**La *Anabaena sp. PCC 7120***
murA	UDP-N-acetilmuramoilalanin-D-glutamat ligaza	Prezentă sub formă de secvențe cu omologie variată față de *murA* de la **E. coli** sau alte cianobacterii	Prezentă (*alr4112*) poziționată între 4955215–4956603pb. are identitate cu secvențe omoloage din **Synechocystis pcc 6803** de 60.2%, codifică o proteină de 463 resturi de AA
murC	UDP-N-acetilmuramat-alanin-ligaza	Prezentă (*slr1423*), poziționată între 3279390–3280907, prezintă identitate de 60% cu gena *murC* de la **Nostoc sp. PCC7120**, codifică o proteină de 505 resturi de AA	Nu a fost pusă în evidență până acum
murD	UDP-N-acetilmuramoil-alanin-D-glutamat ligaza	Prezentă (*sll2010*), poziționată între 1258263–1256905pb, prezintă identitate de 60.0% cu gena *murD* de la **Nostoc sp. PCC 7120**, codifică o proteină de 452 resturi de AA	Nu a fost pusă în evidență până acum
murE	UDP-MurNac-tripeptid sintetaza	Prezentă (*slr0528*), poziționată între: 3484733–3186250, prezintă identitate de 64% cu gena *murE* de la **Nostoc sp. PCC 7120**, codifică o proteină de 505 resturi de AA	Nu a fost pusă în evidență până acum

Denumire genă	**Codifică proteina denumită:**	**La *Synechocystis PCC 6803***	**La *Anabaena sp. PCC 7120***
murF	UDP-N-acetilmuramoil-alanil-D-glutamil-2 6–diaminopimelat-–d-alanil ligaza	Prezentă (*slr1351*), poziționată între 1749146–1750510pb, identitate de 99.0% cu o secvență omoloagă (*murF*) din Synechocystis; codifică o proteină de 454 resturi de AA	Prezentă (*all0036*), poziționată între 3831–36976pb, identitate de 59,2% cu gena omoloagă de la **Synechocystis PCC 6803**, codifică o proteină de 452 resturi de AA
murG	UDP-N-acetil-glucozamin-N-acetil muramil 9 pentapeptid)-pirofosforil-undeca-prenol-N-acetil glucozamin-transferaza	Prezentă (*slr1656*), poziționată între 3458282–3459397, are identitate de 58.0% cu o secvență omoloagă (*murG*) de la **Nostoc sp. PCC 7120**, codifică o proteină de 371 resturi de AA	Nu a fost pusă în evidență până acum
mraY	Fosfo-N-acetil-muramoil-pentapeptid-transferaza	Prezentă (*sll0657*) între pozițiile 3123069–3121972pb, identitate de 58,0% cu o secvență omoloagă (*mraY*) de la **Nostoc sp. PCC 7120**, codifică o proteină de 365 resturi de AA	Nu a fost pusă în evidență până acum

În separarea celulelor-fiice, respectiv în finalizarea formării septum-ului deplin intervin proteine – produși ai genei **envA**, localizată în genomul cianobacteriei *Synechocystis PCC 6803*, între pozițiile 468666 și 467836 perechi de baze. Proteina **EnvA** are 276 resturi aminoacizi și este de fapt enzima UDP – 3–O-acil N – acetilglucozamindeacilaza. Această proteină are o identitate de secvență de 56% cu proteina omoloagă de la **Nostoc PCC 7120.**

Scăderea nivelului proteinelor FtsZ, FtsA, FtsQ, FtsI (PBP3), EnvA și FtsW întârzie sau chiar blochează diviziunea celulară, pe când creșterea peste o anumită limită a nivelului cantitativ al acestor proteine poate avea efect letal. Din această cauză reglajul sintezei acestor proteine devine esențial în menținerea vieții cianobacteriilor.

În controlul diviziunii celulei procariote intervin proteinele M, cea mai importantă fiind MinC, acționând ca inhibitor al diviziunii celulare și este activată, în condiții normale de proteina MinD. Mutația acestei gene condiționează realizarea diviziunii celulare numai de la capetele celulei, ceea ce conduce la formarea de minicelule lipsite de ADN. Proteina MinC are rol esențial în stoparea diviziunii celulare, mutantele **min**$^-$ fiind letale. Genele răspunzătoare de sinteza proteinelor min de la cianobacterii sunt redate în tabelul de mai jos (tabelul 10).

Tabelul 10

Denumire genă	Codifică proteina denumită:	La **Synechocystis PCC 6803**	La **Anabaena sp. PCC 7120**
minC	MinC proteina cu rol în formarea septului de diviziune	Prezentă (*sll0288*) poziționată între 3009251–3008508pb, codifică o proteină de 247 resturi de AA	Prezentă (alr3455), localizată între 4165934–4167034 pb, are identitate de 40,9% cu secvența omoloagă (*minC*) la **Synechocystis PCC 6803**; codifică o proteină de 367 resturi de AA
minD	MinD proteină cu localizare în septul de diviziune și acțiune inhibitorie asupra diviziunii celulare	Prezentă (*sll0289*), poziționată între 3008431–3007631pb, identitatea fiind de 65.0% față de minD de **Nostoc sp PCC 7120**; codifică o proteină de 266 resturi de AA.	Prezentă (*all2003*), poziționată între 2432942–2432154pb, identitate de 25,6 cu *minD* de la **Methanococcus jannaschii** codifică o proteină de 263 resturi de AA
minE	MinE proteină ce determină formarea septului de diviziune	Prezentă (*sls0546*), poziționată între 3007573–3007280pb, are identitate de 59,0% cu *minE* de la **Nostoc sp. PCC 7120** codifică o proteină de 97 de resturi de AA	Prezentă (*asr3457*), poziționată între 4167919–41668212pb, are omologie de 59,3% cu omoloaga din **Synechocystis PCC 6803**; codifică o proteină de 98 resturi de AA.

CAPITOLUL XX

ORGANIZAREA GENOMICĂ MEZOCARIOTĂ

1. INTRODUCERE

Termenul **Mezocaryota** a fost introdus de către J. Dodge, în anul 1965, spre a desemna statul intermediar dintre Procariote și Eucariote, pe care îl are un singur grup de microorganisme fotosintetizatoare actuale — **Dinoflagellata** — a căror morfologie prezintă particularități ciudate, nemaiîntâlnite la alte microorganisme unicelulare, de unde și denumirea lor, introdusă în anul 1920, de către Chatton: termenul de **dinos** semnifică în limba greacă ceva oribil, groaznic, monstruos. Această denumire nu li se potrivește totuși reprezentanților grupului, întrucât, deși au un aspect neobișnuit, construcția lor este frumoasă, complexă și admirabil adaptată mediilor acvatice marine și lacustre; prezentând un fel de carcasă (**theca**), asemănându-se cu două farfurii zburătoare, așezate una pe buzele celeilalte, cu două șanțuri perpendiculare (fig. 1), în fiecare aflându-se câte un flagel care „bate“ în sincronie cu celălalt, imprimând celulei o mișcare de rostogolire, în masa apei. Cromozomii dinoflagelatelor reprezintă o punte fascinantă între aranjamentele fibrilare ale nucleoidului procariotelor și fibra de cromatină, din nucleul eucariotelor. Dinoflagelatele cu viață liberă constituie un grup monofiletic de microorganisme unicelulare, înfrățite cu eucariotele inferioare, dar care au evoluat divergent și fără perspectivă (evoluție „în fund de sac“), de foarte timpuriu, în cursul evoluției biologice pe Terra.

2. CROMOZOMII DINOFLAGELATELOR

Aspectul fibrilar și în formă arcuită a cromozomilor dinoflagelatelor se aseamănă cu aspectul fibrilelor de ADN din nucleoidul bacterian sau

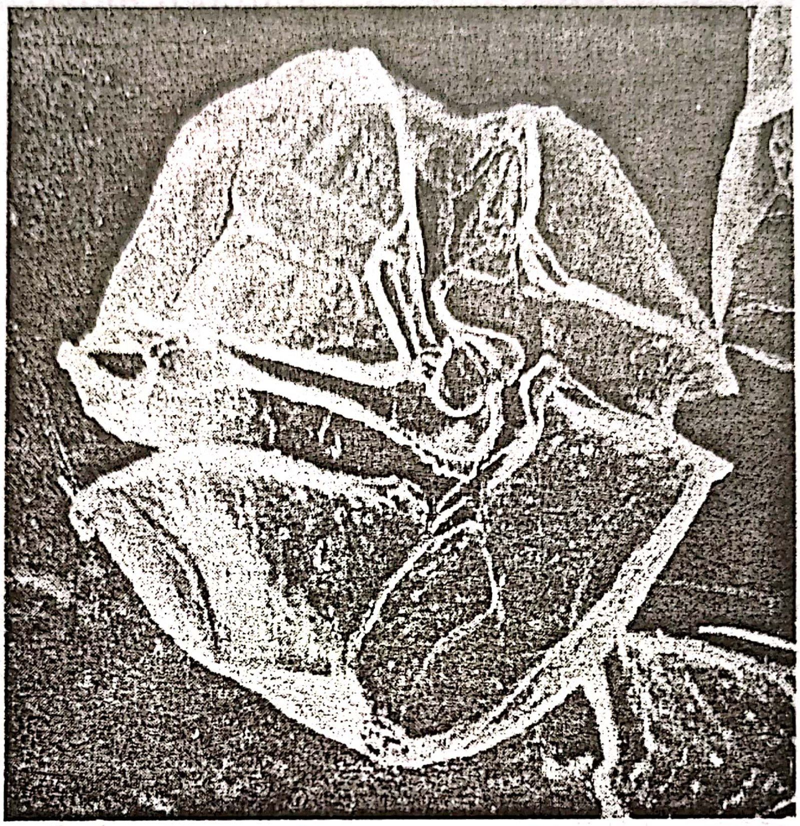


Fig. 1 — Dinoflagelatul *Gonyaulax excavata*, cel care provoacă „înroșirea“ apelor *(red tides – „mareele roșii“)* în estuarul Tamisei din Anglia, dar și în apele Atlanticului de Vest, în Statele Unite ale Americii (fotografie dăruită cu generozitate de către Dr. A.R. Loeblich III, pe când am lucrat împreună, în Biological Laboratories, Harvard University, 1974–1975).

cianobacterian. Cromozomii dinoflagelatelor nu prezintă organizare nucleosomală, caracteristică fibrei de cromatină a cromozomului eucariotic. Organizarea genomică mezocariotă implică un spațiu genetic delimitat de o membrană, adică un nucleu cu membrană nucleară permanentă, o fază S distinctă, de sinteză a ADN, în ciclul celular, și până la 60% ADN repetitiv, interspers cu ADN nerepetitiv, cu secvențe complexe, toate acestea reprezentând caracteristici de eucariote, pentru grupul dinoflagelatelor. Dar, aceeași organizare genetică mezocariotă implică și trăsături specifice procariotelor: necomplexarea ADN cu histone și aspectul fibrilar al cromozomilor. Cromozomii dinoflagelatelor au însă trăsături specifice grupului și anume permanenta lor condensare și absența oricărei colorații diferențiate, longitudinale, atunci când sunt utilizate tehnicile de bandare cromozomală care dau la cromozomii eucariotelor o colorare diferențiată a acestora (benzi G, C, Q, R, T etc.)

Arhitectura particulară a cromozomilor dinoflagelatelor implică existența unor cantități mari de ADN, de 6–10 ori mai mare decât la eucariotele evoluate. În ceea ce privește compoziția chimică a ADN din cromozomii dinoflagelatelor, baza neobișnuită 5–hidroximetiluracil înlocuiește 12–68% din resturile de timină.

Cromozomul dinoflagelatelor este de fapt un aranjament complex, toroidal, de cromatide circulare, spiralizate „într-un aranjament anortospiral de figuri în opt“, după un model de pliere regulată, unic în lumea vie. Dinoflagelatele tipice, libere, au peste 20 de cromozomi, pe când formele parazite precum **Syndinium, Merodinium** și **Atlantocellodinium**, artificial incluse în grupul dinoflagelatelor, au între 4 și 10 cromozomi.

Prima descriere a ultrastructurii nucleului dinoflagelatelor, numit dinocarion, a fost realizată de către celebrul zoolog francez P.P. Grassé, în colaborare cu nu mai puțin celebrul protistolog român Ion Dragescu (Jean Dragesco) al cărui nume figurează și pe harta Lunii, ca un omagiu adus contribuției sale și în astronomie, prin realizarea unor fotografii excepționale asupra astrelor, luate pe când lucra în Africa. După descrierea făcută de Grassé și Dragesco (1957), urmată de aceea realizată de Grell și Wohfarth-Bottermann (1957), și apoi după introducerea termenului de „**Mesokaryota**“, de către Dodge (1965), poate cel mai bun cunoscător al acestui grup de microorganisme, dinoflagelatele au fost foarte intens studiate, la nivel celular, molecular, fiziologic, ecologic și evolutiv. Dodge (1965) a considerat că dinoflagelatele au reprezentat un experiment remarcabil al naturii dar care, asemănător dinozaurilor, au fost înzestrate cu un potențial evolutiv limitat. Cu excepția genului **Syndinium** (care, de fapt, nu este un dinoflagelat tipic) dinoflagelatele sunt lipsite de histone (Ris și Kubai). Existența însă a mai multor cromozomi, permanent condensați, și a unei membrane nucleare, de asemenea permanente, a făcut ca Taylor (1980) să considere că dinoflagelatele sunt cele mai primitive eucariote. Loeblich (1976), unul dintre cei mai profunzi cercetători ai dinoflagelatelor, la nivel molecular și ultrastructural, a afirmat că dinoflagelatele constituie un grup vechi de microorganisme care au evoluat independent față de toate celelelate eucariote, suferind divergență înainte de diferențierea cromatinei eucariote, dar după constituirea secvențelor repetate de ADN.

După Herzog și colaboratorii (1984), dinoflagelatele tipice reprezintă un grup monofiletic de organisme unicelulare care constituie o soră a eucariotelor mai evoluate, dar care prezintă și unele trăsături prin care se aseamănă cu procariotele, în special prin aspectul fibrilar, în formă de arc, al cromozomilor (Giesbrecht, 1965, 1966) care, în anumite condiții chiar capătă aspectul de nucleoid bacterian (Gavrilă și colab., 1985). Atașarea cromozomilor dinoflagelatelor la membrana nucleară a fost analogată cu atașarea nucleoidului bacterian sau cianobacterian la structuri mezosomale, derivate din membrana plasmatică, în vederea segregării nucleoizilor-fii, în celulele-fiice. În atașarea cromozomilor dinoflagelatelor la membrana nucleară sunt implicate și cationii bivalenți (Herzog și Soyer, 1981),

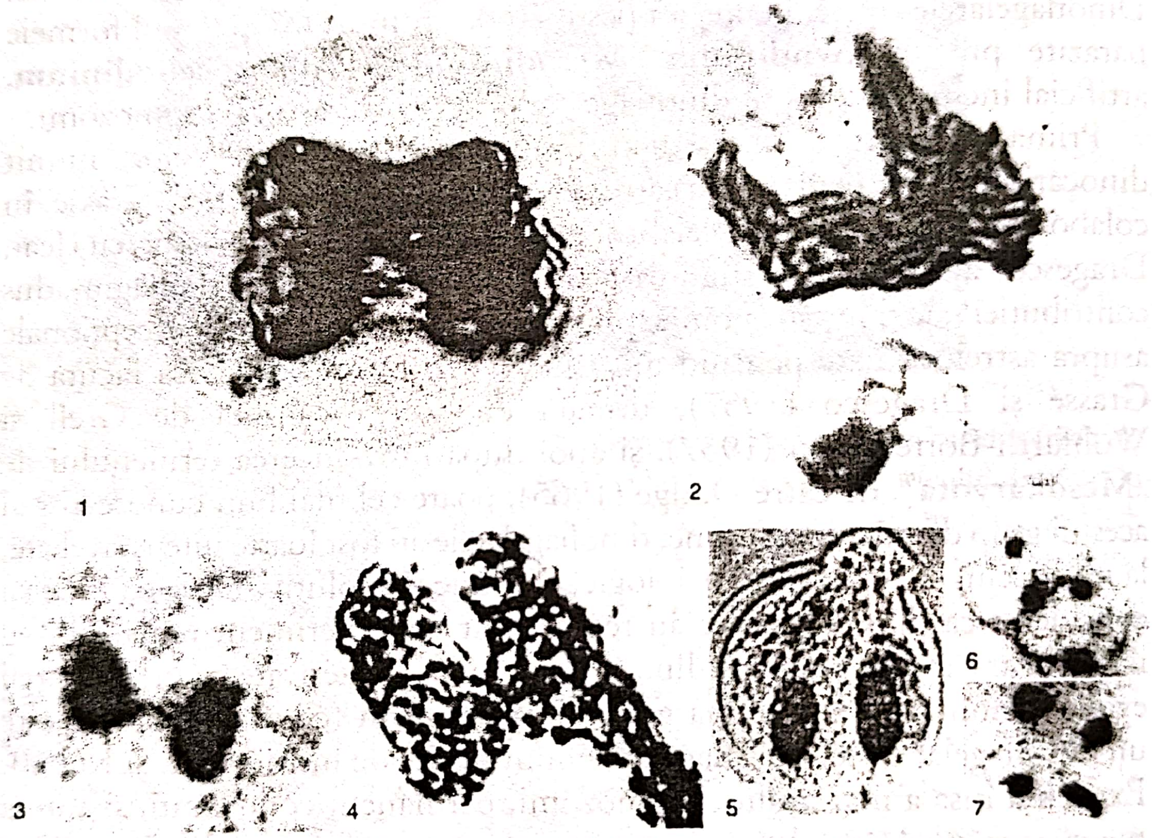


Fig. 2 — Dinomitoza sau diviziunea nucleului dinoflagelatelor.
1. Celulă de *Peridinum tabulatum* într-un stadiu mijlociu al diviziunii sale (dinomitoză) echivalent Anafazei din mitoza tipică a eucariotelor;
2. Nucleu în diviziune, la *Prorocentrum micans*;
3. Telofaza dinomitozei, la *P. tabulatum*;
4. Fuziune nucleară în cadrul procesului sexuat la *Peridinum trochoideum*;
5. Meioza la germinarea zigotului, la *P. trochoideum*;
6, 7. Două imagini ale tetradei meiotice, la *P. trochoideum*: cei patru nuclei haploizi sunt rezultatul a două diviziuni meiotice succesive (original).

molecule de ARN (Herzog și colab., 1984) sau ribonucleoproteine (Gavrilă și colab., 1983, 1985; Gavrilă și Mihăescu, 1986).

Cromozomii dinoflagelatelor sunt alcătuiți din filamente fine de ADN care au un diametru de aproximativ 50µm și ei nu au structură nucleosomală (Hamkalo și Rattner, 1977; Rizzo și Burghart, 1980; Herzog și Soyer, 1981; Gavrilă și Mihăescu, 1986). Ca și la eucariotele tipice, membrana nucleară a dinoflagelatelor este dublă și materialul genetic este distribuit, de asemenea, pe mai mulți cromozomi, iar în nucleu se întâlnesc mai mulți nucleoli. Cercetările lui Dodge (1971) și Gavrilă și colaboratorii (1986) au descris prezența în dinokarion a mai multor nucleoli, evidențiindu-se și regiuni organizator nucleolare tipice (Kubai și Ris, 1969; Soyer și Haapala, 1974; Gavrilă și colab, 1983; Gavrilă și Mihăescu, 1985, 1986). În culturi sincronizate de dinoflagelate s-a descris existența unei faze S, distincte, de sinteză a ADN (Franker, 1971; Galleron și Durrand, 1979).

Studiile de denaturare-renaturare au evidențiat prezența unei mari cantități de ADN repetitiv (până la 60%), interspers cu secvențe complexe de ADN nerepetitiv (Allen și colab., 1975; Steele, 1980; Hinnebusch și colab., 1980). Asemănător eucariotelor, ADN ribozomal al dinoflagelatului **Crypthecodinium cohnii** este organizat în unități repetitive de 15Kb (Steele, 1980). Analizele privind greutatea moleculară, coeficientul de sedimentare, metilarea bazelor și omologiile de secvență au condus la concluzia că ARNr de la dinoflagelate reprezintă o formă timpurie de ARNr eucariotic (Rae, 1970; Hinnebusch și colab., 1980). La **C. cohnii** au fost identificate șase tipuri de **snARN** bonetat, similare în multe privințe cu snARN U1–U6, de la eucariotele superioare (Dodge, 1985).

3. ORGANIZAREA NUCLEARĂ

Persistența anvelopei nucleare la dinoflagelate este pusă în legătură cu absența unui aparat mitotic tipic, participant în diviziunea celulară a acestui grup de microorganisme primitive, numită dinomitoză (fig. 2).

Studiată cu ajutorul microscopului optic, organizarea nucleară a dinoflagelatelor se încadrează în mai multe variante. Una dintre acestea este tipică speciilor al căror nucleu conține între 25 și 275 cromozomi baghetiformi și în care nu au putut fi detectate citochimic histonele. Acest tip de organizare nucleară este specific speciilor de **Amphidinium**, dar și multor alte dinoflagelate, din care cauză s-a numit tipul **Amphidinium** sau tipul **dinokaryotic**. Forma nucleului la reprezentanții acestui tip poate fi lenticulară sau reniformă (**Prorocentrum**, **Exuviaella**), sferică (**Crypthecodinium cohnii**), de U sa V (**Prorocentrum sp.**) sau de potcoavă (**Pyrocystis**, **Gonyaulax**). La **Peridinium tabulatum** și **Ceratium hirundinella**, nucleul este foarte polimorf, **C. hirundinella** având și numărul cel mai mare de cromozomi, dintre dinoflagelate.

Un al doilea tip de organizare nucleară a fost descris de Afzelius (1963) la celulele vegetative de **Noctiluca miliaris** și s-a numit **tipul Noctiluca** sau „**noctikaryotic**". Nucleul în cadrul acestui tip este mare și prezintă cromozomi necondensați, în anumite stadii ale ciclului celular (Zingmarck, 1970), pe când nucleul sporului mobil este mai mic decât cel al celulei vegetative, aceasta din urmă având o organizare mezocariotică tipică, cu cromozomii permanent condensați.

La **Noctiluca miliaris** și **Diplomorpha sp.**, diviziunea nucleară este acompaniată de organizarea unui aparat fuzorial de tip amfiaster.

Tipul **Syndinium** de diviziune nucleară este un tip aparte, considerat în acest cadru numai prin includerea acestui microorganism parazit printre dinoflagelate. Ca și la **Merodinium** și **Atlanticellodinium**, la **Syndinium** au fost descriși 4–6 cromozomi, în formă de „V", ADN este complexat cu histone detectabile citochimic, iar în cursul diviziunii, centriolii acționează ca centrii cinetici.

La speciile de Ellobiophyceae, precum **Haplozoon**, nucleul celulelor vegetative prezintă cromozomi decondensați. De fapt, la dinoflagelatele libere, dinomitoza este un proces complex, o mitoză endonucleară atipică, fără intervenția vreunui aparat acromatic.

După cum rezultă și din figura 3, în cadrul nucleului de **Peridinium tabulatum,** replicarea și clivarea cromozomală sunt desfășurate asincron, la nivelul diferiților cromozomi și nucleul care parcurge diferite etape ale dinomitozei prezintă variații mari de formă și volum. Separarea cromozomilor fii se realizează prin alunecarea mutuală a acestora în cursul mișcării lor spre „polii" opuși ai celulei aflată în diviziune.

Constricția mediană a nucleului care se divide este realizată prin participarea unui aparat extranuclear, în care componentele principale sunt microtubulii citoplasmatici care facilitează invaginația membranei nucleare în zona mediană a nucleului, proces care se finalizează prin geneza a doi nuclei-fii, neexistând nici un moment de dezorganizare/dispariție a membranei nucleare. Cromozomii sunt atașați la membrana nucleară și procesul de clivare a lor este sincronizat cu procesul de sinteză/creștere a membranei nucleare, la nivelul punctului de atașare a cromozomului, astfel că are loc separarea indirectă a cromozomiilor-fii prin creșterea membranei

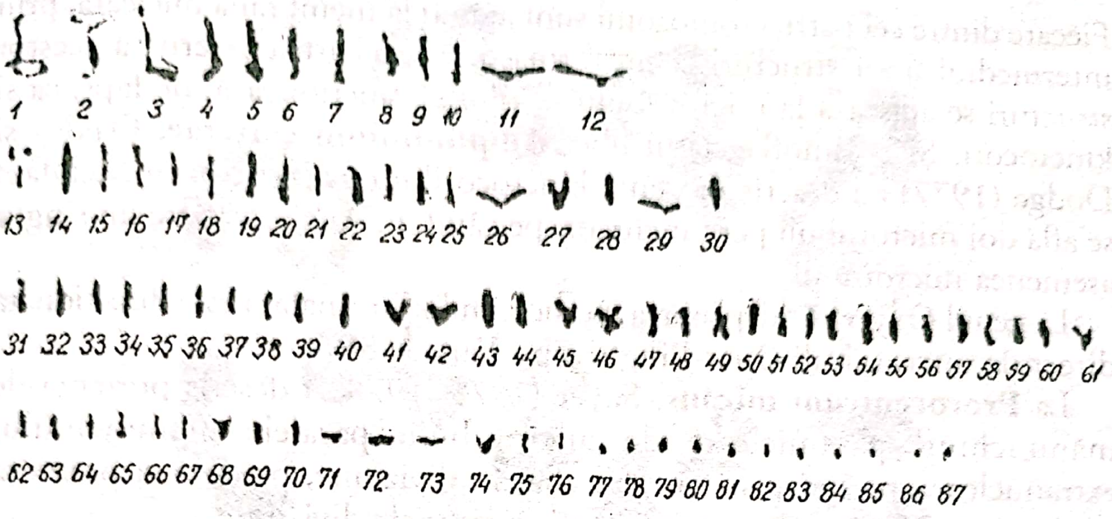

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30
31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61
62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87

Fig. 3 — Tentativă de cariotipare a cromozomilor dintr-un nucleu de *Peridinum balticum*. A se nota formele ciudate ale unora dintre cromozomi (Y, V, I, etc.) care reprezintă stadii intermediare sau finale ale clivării acestora. Faptul că mulți dintre cromozomi prezintă morfologie (dimensiune) identică denotă starea poliploidă sau hiperploidă a nucleului (original).

nucleare între punctele adiacente în care sunt ei atașați, înainte de clivare. În desfășurarea procesului de clivare a crmozomului dinoflagelatului, acesta ia succesiv forma literelor „Y“, „V“ și de cromatide paralele, atunci când aceștia sunt complet separați. Nu s-a evidențiat atașarea cromozomilor la microtubulii din invaginarea nucleară. Invaginarea membranei nucleare devine, la un anumit moment, continuă, dar membrana nucleară nu este niciodată destrămată, la nivelul acesteia. Microtubulii cu diametrul de 180Å se organizează la nivelul invaginației și ei pot contribui la desăvârșirea separării nucleilor-fii.

Cromozomii dinoflagelatelor nu au centromeri și nu se atașează la microtubuli, astfel că problema separării cromozomilor-fii în cei doi nuclei-fii, rezultați prin dinomitoză, nu este pe deplin înțeleasă.

La **Prorocentrum micans** au fost evidențiate structuri microtubulare intranucleare, considerate a fi implicate în mișcarea cromozomilor spre polii opuși ai nucleului aflat în diviziune.

Mitoza sindiniană, descrisă la **Syndinium**, este cu totul particulară. Ris și Kubai (1974) au identificat particularitățile sale: inserția persistentă a kinetochorilor în anvelopa nucleară deschisă, asocierea persistentă dintre microtubuli și kinetocori, existența unui fus central extranuclear, format între centrioli și localizarea sa în canalul citoplasmatic ce trece prin nucleu.

Fiecare dintre cei patru cromozomi sunt atașați la membrana nucleară, prin intermediul unor structuri ce au formă de disc. Partea externă a acestor structuri se atașează la microtubulii fusului și funcționează, de fapt, ca și kinetocori. Și la dinoflagelatul liber **Amphidinium carterae**, Oakley și Dodge (1977) au descris prezența kinetocorilor de acest tip. În Metafază se află doi microtubuli per kinetocor, pe când, în Anafază apare un singur asemenea microtubul.

La genul **Oxyrrhis**, deplasarea cromozomilor în Anafază este direcționată direct de microtubuli (Xias-Ping și Jing-Yan, 1986).

La **Prorocentrum micans**, Soyer (1975, 1978) a descris prezența de mănunchiuri paranucleare de microtubuli, paralele mănunchiului extranuclear, trecând prin nucleul aflat în diviziune, precum și prezența unei axe cromozomale în cromozomi, înainte de diviziune.

Studiul structurii cromozomale și a diviziunii nucleare, realizat de către Oakley și Dodge (1977) la **Amphidinium carterae, A. rhyncocephalum** și **Glenodinium halli** a evidențiat natura dublu-helicoidală și spiralizarea toroidală a cromonemelor cromozomului dinoflagelatelor, precum și faptul că la mijlocul diviziunii, cromozomii au formă de „V“, vârful acestuia fiind în contact cu membrana nucleară, la nivelul unor tunele mitotice în care se află microtubuli înmănunchiați.

În meioza dinoflagelatelor apar particularități distincte. Procesul are loc după fuziunea gameților de sex opus, la germinarea zigotului. În anul 1973, von Stoch a descris așa-numita „cicloză nucleară“, reprezentând o rotație a conținutului nucleului cistului, adică al zigotului, cu păstrarea intactă a anvelopei nucleare.

Încă din anul 1910, Borgert a descris acest proces sub denumirea de „Knäuel-stage“, care corespunde unei faze postzigotenice, din meioza tipică. Aspecte tipice pentru meioza dinoflagelatelor au fost descrise de Gavrilă (1978, 1996), surprinzând faptul că, asemănător meiozei desfășurate la eucariotele superioare, și în meioza dinoflagelatelor, rezultatul celor două diviziuni meiotice succesive este tetrada (vezi fig. 2).

Recombinarea genetică, ca rezultat al reproducerii sexuate, a fost evidențiată la **Crypthecodinium cohnii**, de către Tuttle și Loeblich (1974, 1977), utilizând mutante deficiente în carotenoizi, numite mutante „**albino**“, induse prin tratament cu NTG.

Celula dinoflagelatelor poate găzdui diferiți simbionți. Existența a două tipuri de nuclei, unul mezocariotic, altul eucariotic, în aceeași celulă de dinoflagelat, reprezintă unul dintre cele mai ciudate fenomene legate de acest grup de microorganisme. Acest fenomen a fost descoperit de către

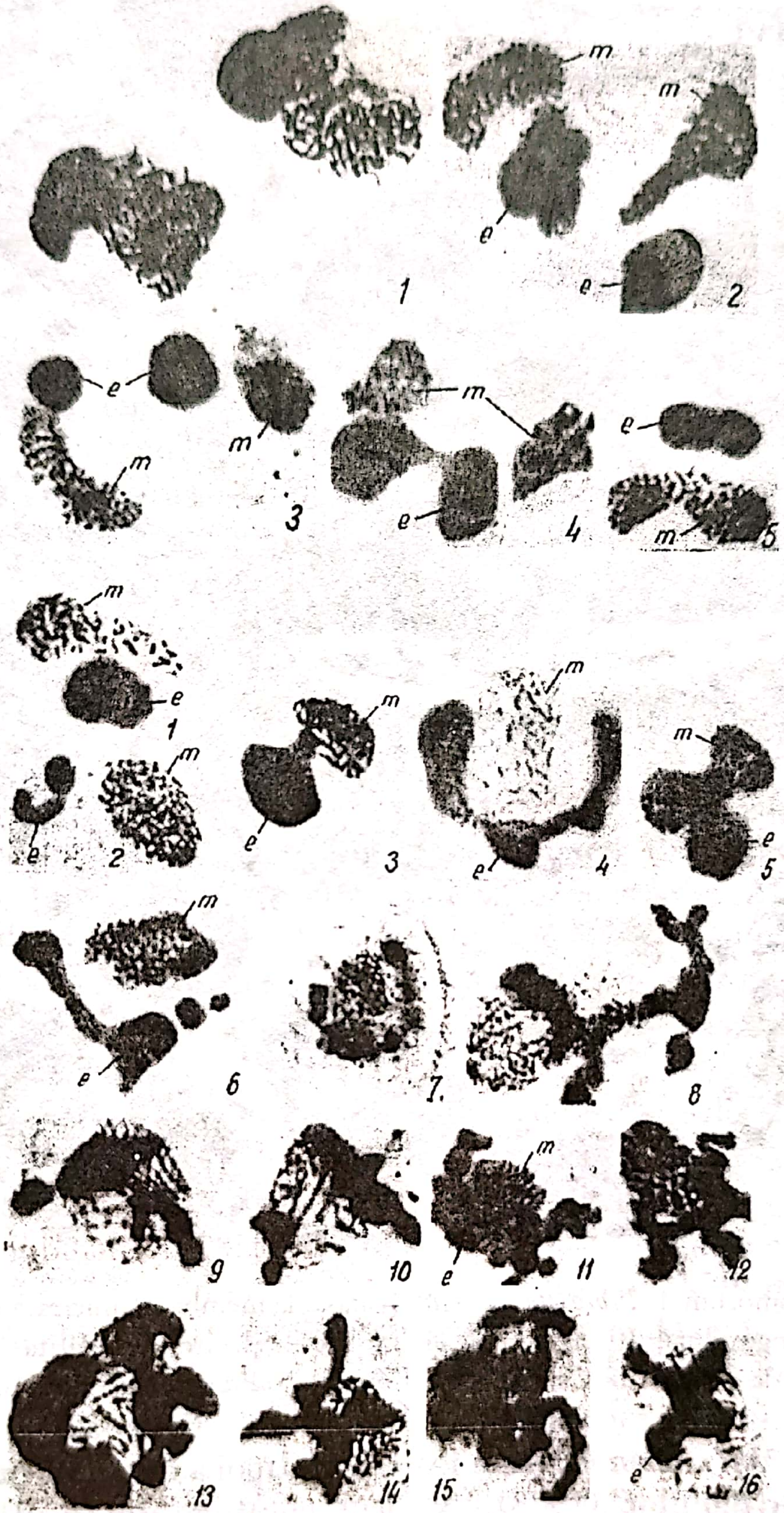

m
m
e
e
1
2
e
e
m
m
3
m
e
4
e
m
5
m
e
1
m
e
2
m
e
3
m
e
4
m
e
5
m
e
6
7
8
9
10
m
e
11
12
13
14
15
e
16

Fig. 4 — Prezența în aceeași celulă a doi nuclei, unul cu organizare mezocariotică (m), celălalt cu organizare eucariotă (e), la *Peridinum balticum*. A se remarca înalta sincronie în diviziunea celo doi nuclei (original).

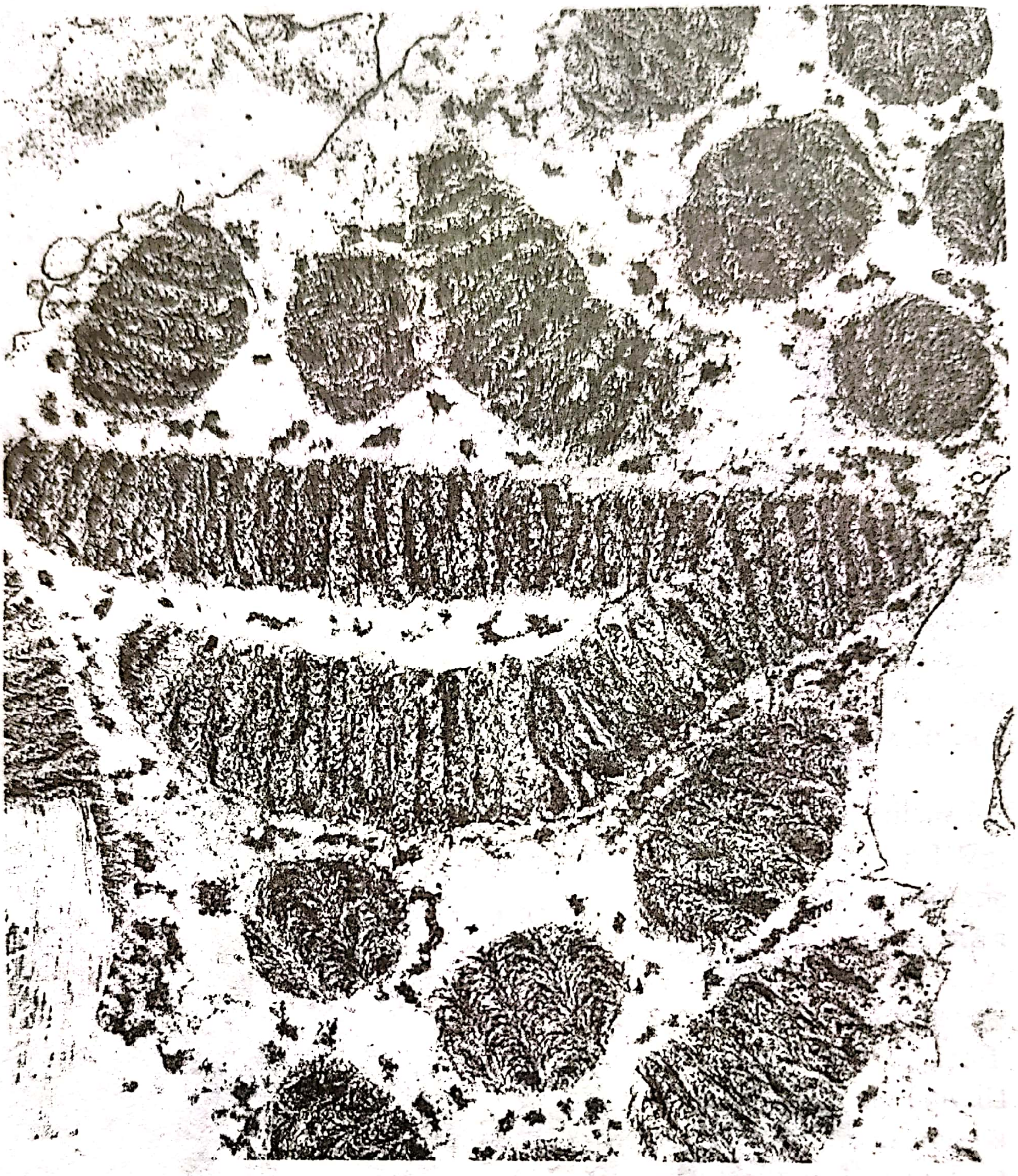


Fig. 3 — Cromozom de *Prorocentrum micans* atașat la membrana nucleară și aflat în faza de clivaj longitudinal (fotografie la microscopul electronic, oferită cu deosebită generozitate, de către Marie-Odille Soyer-Gobillard – Franța) x 21.900.

Dodge (1971) la **Glenodinium foliaceum**, apoi a fost confirmat de către **Blanchardt-Babillot** (1973). Nucleul eucariot este Feulgen-pozitiv, polimorfic, conținând o cantitate mare de ADN.

Gavrilă (1977) a studiat relația nucleu mezocariot — nucleu eucariot la **Peridinium balticum** și **P. tabulatum**, la această din urmă specie o asemenea relație fiind identificată, încă din anul 1971. La **P. balticum** se poate constata înaltul grad de sincronizare a diviziunii celor doi nuclei (fig. 4).

Înaltul polimorfism al nucleului dinoflagelatelor amintește de acela al ciliatelor și nu este exclus ca endosimbiontul să fie un ciliat.

La nivel ultrastructural, cromozomul dinoflagelatelor apare cu totul diferit de cromozomul eucariotelor, nu numai prin starea sa permanent condensată, dar și prin organizarea sa ultrastructurală (fig. 5).

Componenta majoră a cromozomilor dinoflagelatelor este ADN, pe când componenta proteinică este mult mai puțin reprezentată cantitativ. Celula dinoflagelatelor conține o cantitate foarte mare de ADN, comparativ cu alte grupe de organisme nucleate. Astfel, la **Gonyaulax polyedra**, s-a estimat o cantitate de 200 pg ADN per celulă, comparativ cu 5pg ADN per celulă, întâlnită la om (Allen și colab., 1975).

4. ADN CROMOZOMAL

Cercetările lui Haapala și Soyer (1974) asupra lui **Gyrodinium/ Crypthecodinium cohnii** și **Prorocentrum micans** au arătat că ADN cromozomal este compus din molecule circulare de ADN, fiecare constituind o singură cromatidă a unei structuri politenice, cum a fost inițial considerat a fi cromozomul dinoflagelatelor, aceste cromatide având 25–35µm, la **G. cohnii**, și 130–160µm, la **P. micans**. S-a calculat un grad de politenie de 700, la prima specie și 1.300, la cea de a doua. Cantitatea haploidă de ADN a fost estimată la 3.000µm de dublu-helix, la **G. cohnii**, și 9.860µm de dublu-helix, la **P. micans**, ceea ce înseamnă de 2,1 și respectiv de 7 ori mai mare decât a bacteriei **Escherichia coli**.

Soyer-Gobillard și colaboratorii (1990) au evidențiat configurații B (dextrogire) și Z (levogire), în ADN din cromozomii de **P. micans**.

În absența histonelor, stabilizarea superspiralizării ADN în cromozomii dinoflagelatelor se realizează cu ajutorul cationilor bivalenți. Prezența unor baze rare, metilate și conținutul GC înalt facilitează tranziții locale B-Z. Stabilizarea segmentelor cu ADN-Z poate reduce sau represa superhelicitatea în moleculele ADN circular covalent închise. Aceste segmente de ADN-Z apar în zone limitate ale cromozomilor, adesea la periferie și mai ales în apropierea bifurcației de separare a cromozomilor dinoflagelatelor, în procesul lor de clivare. În nucleol, ADN-Z apare numai în regiunea

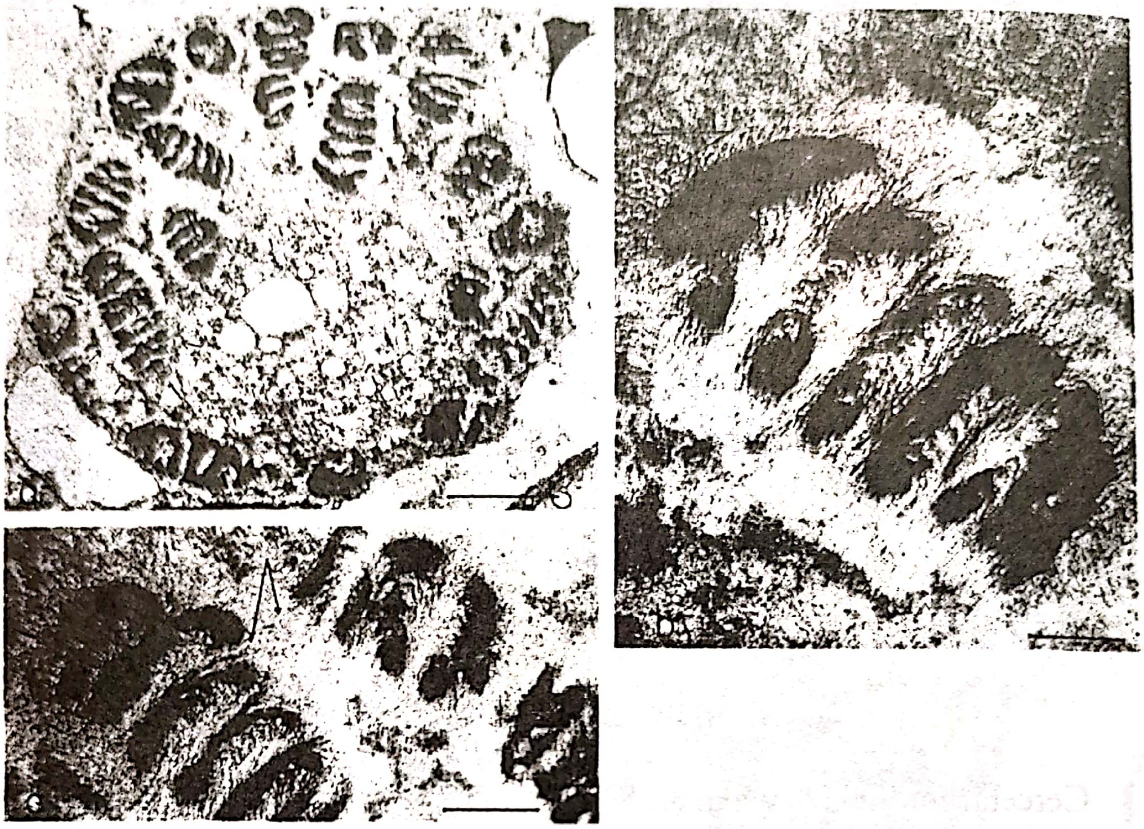


Fig. 6 — Structura fină a nucleului și a cromozomilor de *Prorocentrum micans*. a. Aspectul general al nucleului; săgețile indică „sfera cromozomală" și nu = nucleol. Bara reprezintă 1µm. x 24.500; b. Atașarea cromozomului la anvelopa nucleară (ne) prin fibrile de ADN (săgețile); bara = 0,25 µm. x 116.000; c. fibrile intercromozomale (conective intercromozomale) (săgețile) bara = 0,50 µm. x 136.000 (original).

organizator-nucleolară (NOR). Conformația ADN-Z reprezintă zona posibilă pentru desfacerea dublului helix spre procesarea în transcripție, în absența structurilor nucleosomale. Interesant apare faptul că în cadrul unor experiențe de reconstituire „in vitro" de structuri nucleosomale, ADN de dinoflagelate se comportă asemănător ADN de SV40, în sensul că dacă este amestecat cu histone eucariote tipice, are loc autoasamblarea unor structuri care sunt de tip nucleosomal. Asemenea experiențe au constituit o dovadă în plus, deși indirectă, privind absența histonelor tipice din nucleul, respectiv cromatina, dinoflagelatelor.

Allen și colaboratorii (1980) au evidențiat că la **Crypthecodinium cohnii**, aproximativ 1/2 din genom cuprinde secvențe unice, interspersе, la circa 600 perechi de nucleotide, reprezentând cam 95% din numărul total de elemente unice intersperse, din genom. Celelalte 5% din genom sunt întrerupte de secvențe repetitive, de cel puțin 4000 perechi de nucleotide.

Aproximativ 80% din ADN repetitiv (20–30% din genom) este interspers printre secvențele unice. Spațiile strânse dintre repetițiile scurte, intersperse prin cea mai mare parte a genomului, explică structurile reticulate observate în microscopia electronică, la cromozomii dinoflagelatelor (fig. 6) ca și valoarea Cot redusă a fragmentelor moderat de lungi. Reasocierea de secvențe repetate de diferite familii generează o clasă neobișnuită de heteroduplexuri, vizualizate electronomicroscopic. Apariția unui asemenea aranjament de secvențe repetate poate reflecta natura neobișnuită de organizare a nucleului dinoflagelatelor. Dar, în unele privințe, organizarea secvențelor din ADN al acestui dinoflagelat seamănă cu aceea întâlnită la eucariotele superioare, plante și animale.

Dacă ținem cont că organizarea nucleară dinoflagelată este una primitivă, înseamnă că interspersia de scurtă perioadă de repetiții scurte, printre secvențe unice de ADN, a apărut de foarte timpuriu, în evoluția genomului eucariot. Speciile care sunt lipsite de asemenea clasă de secvențe repetate pot fi considerate fie că au pierdut această clasă de secvențe, la un anumit moment al evoluției lor, fie că au pierdut capacitatea de a regenera periodic o asemenea repetiție, sau există alternativa ca această formă de organizare a secvenței ADN să fi apărut independent, la o mare varietate de forme, inclusiv la dinoflagelate, ciuperci inferioare, plante superioare și animale nevertebrate și vertebrate, ceea ce reprezintă exemple remarcabile de evoluție divergentă care implică patru linii evolutive care au derivat independent, din protiste uicelulare.

În ciuda afinităților organizării nucleare a dinoflagelatelor cu procariotele, s-ar putea ca aceste microorganisme să nu fie atât de primitive precum s-a crezut. Ele ar putea foarte bine să reprezinte eucariote degenerate care au pierdut organizarea structurală tipică pentru cromatina eucariotă și, în consecință, au dezvoltat un mecanism neobișnuit al mitozei.

Cercetările lui Ris (1962) și Dodge (1964) au relevat doar absența histonelor tipic eucariote, din nucleul dinoflagelatelor. Pe de altă parte, **Syndinium** — formă parazită - conține mari cantități de proteine bazice (Ris și Kubai, 1974), ca și dinoflagelatul neobișnuit **Oxyrrhis**, considerat o formă primitivă de dinoflagelat (Dodge, 1985). Aceste date pledează pentru scoaterea genului **Syndinium** dintre dinoflagelate, iar situația lui **Oxyrrhis** creează confuzii, dar în toate aceste abateri de la trăsăturile specifice dinoflagelatelor, mai ales în ceea ce privește existența histonelor, trebuie luată în considerație situația prezenței unui nucleu eucariot, în celula dinoflagelatelor. Analiza moleculară realizată pe ADN total, din asemenea celule, va semnala, desigur, prezența de histone eucariote și de secvențe tipice pentru ADN eucariot.

Primul studiu biochimic asupra cromatinei dinoflagelatelor a fost efectuat la **Cryphtecodinium (Gyrodinium) cohnii** de către Rizzo și Nooden (1972), stabilindu-se că aceasta conține ARN și proteine nucleare acid-solubile șI acid-insolubile, într-un raport de 0,009/0,48/0,008, față de cantitatea de ADN, raportate la unitatea de greutate moleculară. Proteinele acid-solubile, adică bazice, nu prezintă însă un pattern de migrare electroforetică asemănător fracțiilor histonice ale eucariotelor. Ele au o greutate moleculară de aproximativ 16.000 daltoni și se deosebesc de histonele eucariotelor, deoarece conțin cisteină și acizi aromatici. Doar una dintre benzile electroforetice predominante migrează similar histonei IV, de la porumb.

Și modelul electroforetic al proteinelor acid-insolubile este total diferit de acela al histonelor eucariote.

La **C. cohnii**, raportul cantitativ față de ADN, al ARN, al proteinelor acid solubile și al proteinelor acid insolubile a fost de 0,32; 0,13 și respectiv 0,99.

Nucleii de **C. cohnii**, **P. trochoideum** și **G. nelsoni** conțin 6, 9, 34 și 143 picograme ADN.

La **P. trochoideum**, valorile respective sunt: 0,2; 0,08 și 1,22, pe când la **G. nelsoni** acestea au fost 0,21; 0,10 și 1,09.

Prin utilizarea electroforezei bidimensionale, s-a evidențiat la **C. cohnii** existența unui scaffold cromozomal compus în principal din poteine acide. Cantitatea mare de ADN în nucleii dinofalgelatelor a fost intrpretată în sensul statului poliploid al acestora, sau în sensul redundanței secvențelor ADN (ADN repetitiv).

Cercetările lui Rae și Steele (1973, 1976 și 1978), efectuate la **Crypthecodinium cohnii** și alte dinoflagelate, au evidențiat faptul că 63% din resturile de timină din ADN-ul dinoflagelatelor sunt înlocuite cu 5–hidroximetiluracil, situație care nu se întâlnește la nici o altă specie de eucariote.

Prin analiza cineticii de denaturare-renaturare a ADN de la dinoflagelate, Loeblich și colaboratorii (1975, 1976) au evidențiat diferența acesteia față de ADN bacterian, stabilind că există un pattern de secvențe repetate lungi de 500–600 perechi de baze, secvențe care sunt intersperse cu secvențe unice, ce reprezintă, ca și la eucariotele superioare, 40% din ADN total. Cinetica renaturării, precum și studiile de mutageneză (Roberts și colab., 1974, 1976) vin în contradicție cu ipoteza avansată de către Haapala și Soyer (1973), privind natura diploid-politenică a nucleului dinoflagelatelor.

Stabilizarea cromozomilor dinoflagelatelor este asigurată de prezența în structura lor a ionilor de fier și nichel, neîntâlniți în cromatina eucariotelor. În cromozomii dinoflagelatelor, asemenea metale de tranziție formează punți ionice între acizii nucleici și matrixul proteinic (Kearns și Sigee, 1983). Herzog și Soyer (1983) au afirmat că stabilizarea arhitecturii permanent condensate a cromozomilor dinoflagelatelor este asigurată și de către ionii de Ca^{2+} și Mg^{2+}, fapt dovedit prin utilizarea agenților chelatori, precum EDTA și EGTA care, fixând acești cationi, determină ca structura cromozomilor dinoflagelatelor să fie destrămată, rezultând fibrile cromozomale care își pierd aranjamentul cunoscut din structura nativă a acestor cromozomi. Au fost evidențiate două situsuri pentru asemenea cationi, unul pentru Ca^{2+}, altul pentru Mg^{2+}. Compactarea helicoidală a filamentelor cromozomale (nucleofilamentelor) într-o ierarhie de șase nivele de organizare, pornind de la dublul-helix ADN, la mănunchiul dublu helicoidal pe care îl are cromozomul, este asigurată de asemenea cationi bivalenți.

Fibra de cromatină a dinoflagelatelor apare ca o structură fibrilară netedă, de 1,6 nm diametru, atunci când sunt aplicate tehnici de împrăștiere (Haapala și Soyer, 1973; Hamkalo și Rattner, 1977; Oakley, Dodge, 1979; Rizzo și Burghardt, 1980; Herzog și Soyer, 1981). Când prin asemenea tehnici se studiază cromozomii dinoflagelatelor cu cele două tipuri de nuclei, nucleul mezocariot, spre deosebire de cel eucariot, nu prezintă organizare nucleosomală tipică. Cu toate eforturile depuse pentru multe decade, în vederea elaborării unui model de organizare a cromozomului mezocariot, nu există, totuși, unanimitate de vederi, în această problemă.

5. MODELE DE ARHITECTURĂ CROMOZOMALĂ LA DINOFLAGELATE

Primul model de arhitectură a cromozomului mezocariot a fost elaborat de Grassé și Dragesco (1957), potrivit căruia, cromozomul dinoflagelatelor constă dintr-o cromonemă spirală, alcătuită din numeroase fibrile. În anul 1961, Giesbrecht a propus un alt model, mai întâi sub forma unui sistem superspiralizat, iar mai apoi modelul serpentinei spiralizate, în care buclele cromonemei se pliază înapoi, fiind menținute de o structură longitudinală.

În anul 1968, Bouligand și colaboratorii au elaborat un model de structură a cromozomului dinoflagelatelor, pe baza analizei ultrastructurii și aplicării modelării matematice. Potrivit acestui model, cromozomul dinoflagelatelor constă, în esență, dintr-un număr de discuri, în care fibrilele stau în unghiuri drepte față de axa lungă a cromozomului, menținându-se continuitatea fibrilelor între discuri. Prin aplicarea tehnicii de împrăștiere, pusă la punct de O. Miller (1968), Haapala și Soyer (1973, 1974) au evidențiat că, de fapt, cromozomul dinoflagelatelor constă din cromatide circulare, reciproc, relațional, răsucite într-un aranjament anortospiral de „figuri în 8“, în cazul speciei **Prorocentrum micans** (cu cromozomi lungi) sau într-un pattern regulat la **Crypthecodinium cohnii** (cu cromozomi scurți). S-a conchis că telomerele (capetele cromozomilor) sunt unite, ceea ce sugerează că ADN formează bucle continui, descrise de Oakley și Dodge (1979), la **Amphidinium carterae**, la care au constat că mănunchiuri toroidale de fibrile cromozomale sunt înfășurate plectonemical, într-un dublu-helix strâns. După Hamkalo și Rattner (1977), la **P. micans** cromozomii apar în forma lor normal condensată, ca baghete bandate, înconjurate de o zonă periferică de fibrile dispersate. Fibrilele solitare din această zonă au 55–65Å diametru. Livolant și Bouligand (1978, 1980) consideră cromozomul dinoflagelatelor drept un cristal lichid de tip cholesteric, structura fină a acestuia apărând ca serii suprapuse de arcuri de fibrile de ADN care dau un pattern transvers de serii de benzi întunecate separate de regiuni clare. În anul 1979, Oakley și Dodge au elaborat un model de arhitectură a cromozomului dinoflagelatelor în care fibrilele ADN sunt aranjate după un model toroidal. În ceea ce privește sinteza ADN, Loeblich (1976) a evidențiat la **Cachonina niei** o fază discretă, S, de sinteză a ADN. Galleron și Durrand (1979) au confirmat existența unei asemenea faze, la **Amphidinium carterae.** Totodată, acești autori au propus un model de arhitectură a cromozomului dinoflagelatelor în care există un ax central de fibrile de 9nm diametru în jurul căruia apare un helix interior și un helix exterior, deopotrivă alcătuite din fibrile de 2,5nm. La helixul exterior sunt atașate granule de 9nm diametru.

Herzog și colaboratorii (1984), aplicând tehnici îmbunătățite, au putut descifra structura globală, pe cromozomi intacți (**whole-mounted chromosomes**), precum și structura fină, de detaliu, a cromozomilor dinoflagelatelor. Nucleofilamentele subțiri care ies din asemenea cromozomi sugerează că fibrilele cromozomale ale mănunchiului dublu-helical sunt aranjate prin mai multe nivele de înfășurare helicală, pe când cele care sunt desfăşurate artificial produc un halou de nucleofilamente, în jurul cromozomilor împrăştiaţi.

Cromozomii parţial desfăşuraţi prezintă cinci clase de grosime a fibrelor: 1) nucleofilamente unitare de 6nm diametru şi legate de ADN dublu-catenar; 2) asocieri de duplexuri ADN, cu diametru de 10nm; 3) filamente de 10nm, înfăşurate într-un singur helix, cu diametru de aproximativ 18nm; 4) două nucleofilamente cu diametru de 18nm, spiralizate într-un dublu-helix senestral, cu diametrul variabil între 25 şi 31nm şi care este compactat într-un singur superhelix senestral şi 5) un superhelix singur, cu un diametru de 43–56nm. La nivelul final de compactare, fibrele cromozomale sunt aranjate într-un mănunchi dublu-helical dextral, reprezentând cromozomul nativ de 1250±200nm diametru (Herzog şi Soyer, 1983).

Pe o asemenea bază, întregul cromozom constă din numai 4 molecule de ADN, ipostază cunoscută sub numele de „fibrele de 6nm ale lui Herzog". Această alternanţă de dublu-helixuri într-o structură superspiralizată helicală, singulară, apare a oferi mijlocul de împachetare a unei cantităţi mari de ADN în cromozomi relativ compacţi. Orientarea preferenţială a filamentelor ADN în cromozomul dinoflagelatelor este una normală faţă de axa cromozomală şi nu paralelă la axă, ca în cromozomii politeni.

Cercertările româneşti (Gavrilă , 1978; Gavrilă şi colab., 1983, Gavrilă şi Mihăescu, 1985, 1986) au evidenţiat prezenţa în jurul cromozomilor dinoflagelatului **Prorocentrum micans** a unei aşa-numite „sfere cromozomale" (fig. 6, fig. 7c, d), care probabil reprezintă particule ribonucleoproteinice ce reprezintă fie produşi de transcripţie, fie componente structurale complexate cu ADN cromozomal şi care stabilizează structura cromozomului la dinoflagelate (fig. 7).

Corpii granulari descrişi de Soyer şi Haapala (1975) ca fiind dispuşi între cromozomii-fii, în cursul clivajului cromozomului replicat, pot reprezenta asemenea particule ribonucleoproteinice. Când asemenea componente sunt complet eliminate sub acţiunea complexelor enzimatice ribonucleazice-proteazice, cromozomul dinoflagelatelor se despiralizează şi fibrilele sale trec într-o stare de relaxare totală (fig. 8). Este posibil ca structurile cromozomale axiale, detectate de Soyer (1978) să reprezinte chiar asemenea ribonucleoproteine, implicate în superspiralizarea fibrilelor ADN, la nivel de cromozom nativ condensat. Cercetările noastre au confirmat pe cele ale lui Oakley şi Dodge (1979) potrivit cărora cromozomul dinoflagelatelor este o structură circulară, reprezentând cromoneme (fibre ADN înmănunchiate) toroidale, dublu-helicoidale, absenţa capetelor libere

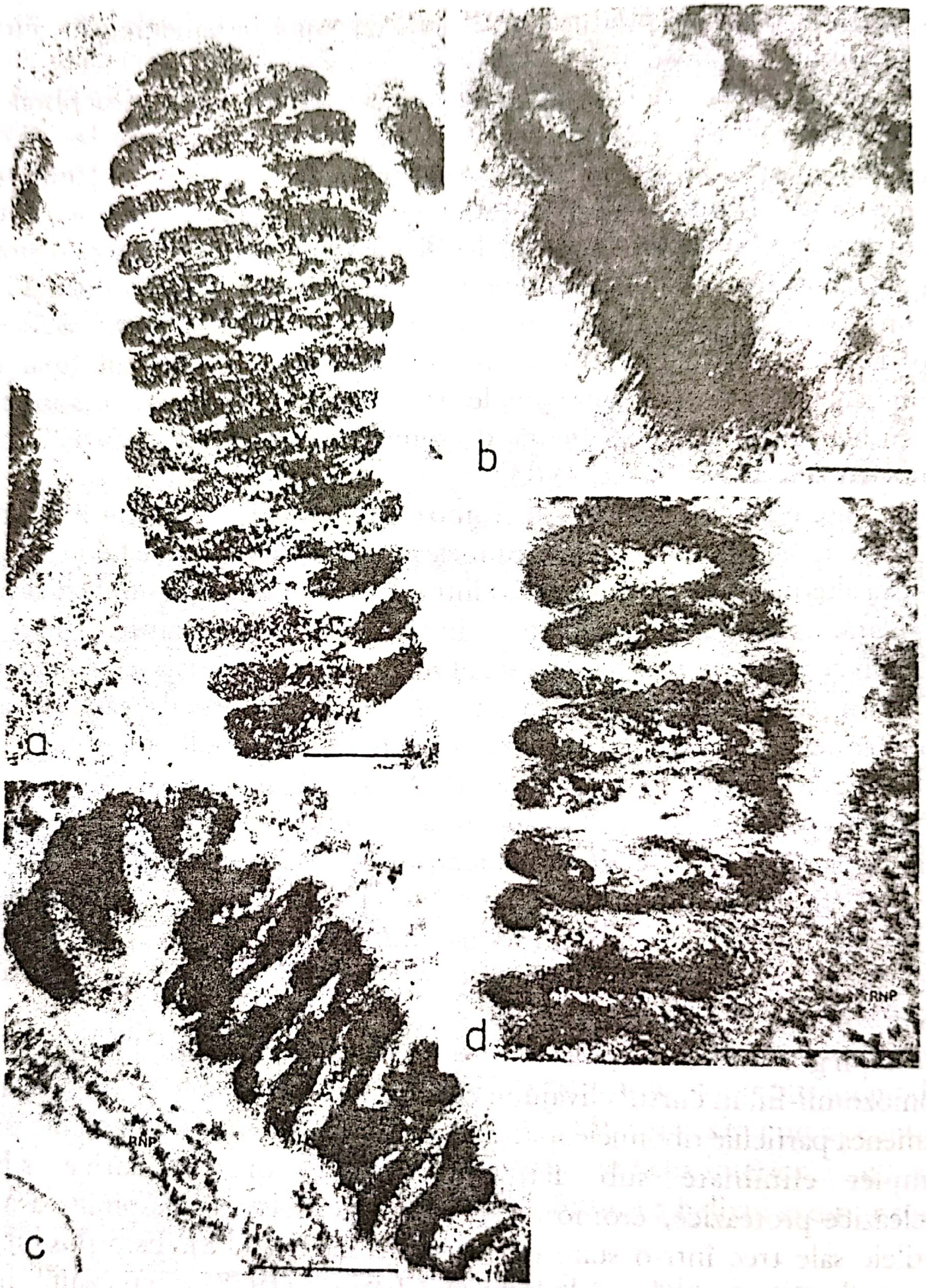


Fig. 7 — Figură „în opt", la cromozomul de *Prorocentrum micans*.
a și b. duplicitatea și structura circulară aparentă a cromozomului dinoflagelatelor.
c și d. sistem de spiralizare în serpentină, la cromozomii de *P. micans*.
a x 90.000; b x 80.000; c x 130.000; d x 115.000
Toate barele = 0,25 μm; RNP = ribonucleoproteine (original).

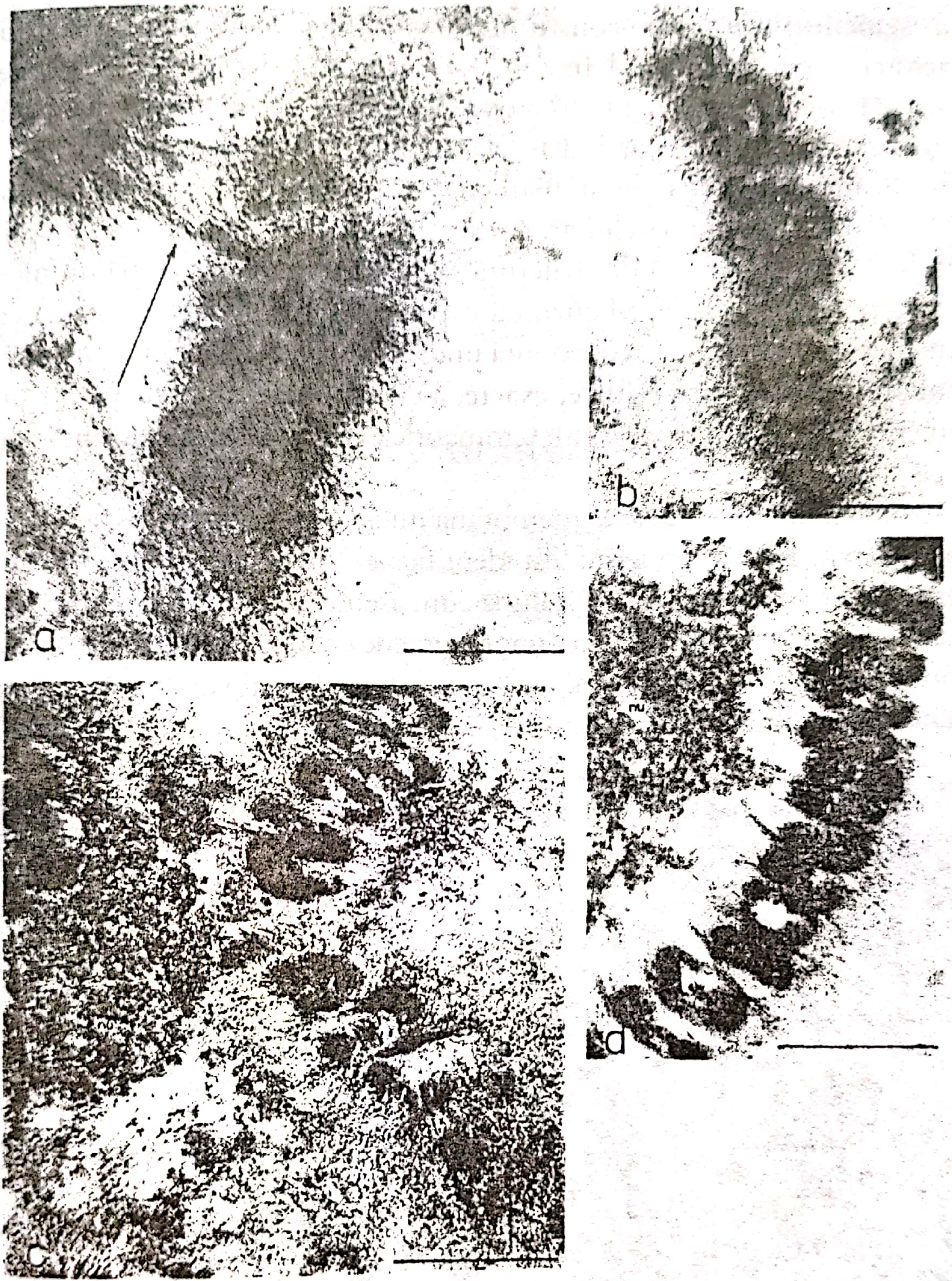


Fig. 8 — Structura fibrilară a cromozomilor de *P. micans*.
a. conective intercromozomale (săgeata)
b–d. cromatide circulare
a x 140.000; b x 93.000; c x 70.000; d x 60.000
Barele = 0,25 µm în a și b și 0,5 µm în c și d (după Gavrilă și Mihăescu, 1986).

din asemenea cromozomi constituind deopotrivă o consecință și o dovadă a acestei circularizări (vezi fig. 7). Cromozomul dinoflagelatelor este o structură circulară, superspiralizată pe o cale înalt specifică, prin intercalare de molecule de ARN, devenind astfel o structură toroidală ce prezintă forma cifrei 8, înfășurată într-un aranjament anortospiral. În stare condensată, cromozomul dinoflagelatelor are formă de baghetă, în microscopia optică, și în forma caracteristică de structură bandată transversal, după un model alternativ de benzi și interbenzi, cu o periodicitate perfectă, dovadă că o asemenea bandare nu este consecința unor secvențe specifice ci, mai curând, rezultatul înfășurării periodice, exacte, a cromonemelor circulare ale unui asemenea cromozom (fig. 7 și 8). Cromatidele total desfăcute prezintă figură de „8".

Cromozomul este atașat la membrana nucleară și rămâne atașat în cursul replicării sale. La **P. micans** au fost identificate conective cromozomale între cromozomii neomologi (fig. 9), după cum asemenea conective pot să apară și între cromozomii-fii. Prezența unor asemenea conective între cromozomii neomologi reprezintă probabil un semn al organizării supracromozomale a genomului mezocariot, aspect care, la genomul eucariot este bine dovedit.

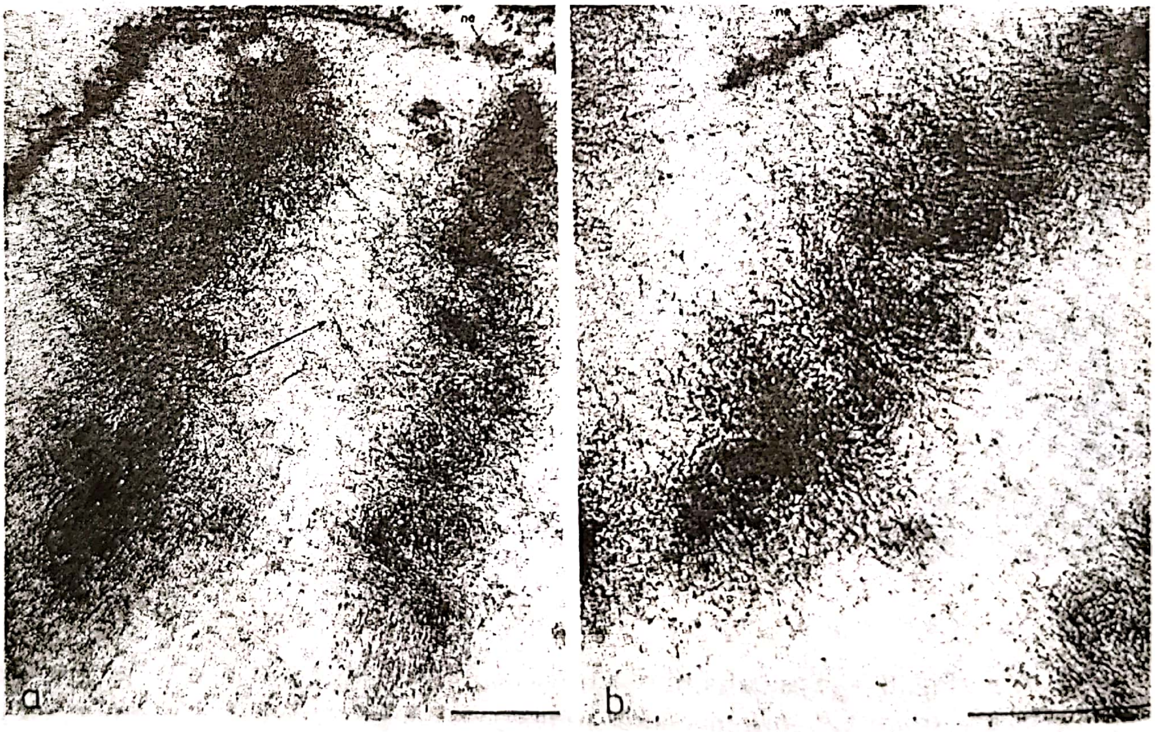


Fig. 9 — Stare de despiralizare extensivă a cromozomilor de *P. micans*. a x 50.000; b x 74.000. Bara = 0,5 μm (după Gavrilă și Mihăescu, 1986).

Datele noastre (Gavrilă și Mihăescu, 1985, 1986; Gavrilă și colab., 1985) sugerează că asemenea genofori, reprezentați de cromozomi individuali, ar fi putut fi organizați prin procese de condensare locală, la nivelul unei molecule gigant de ADN care a constituit un nucleoid original. La **P. micans**, în anumiți nuclei din celule aflate într-un stadiu înaintat al apoptozei sau senescenței, cromozomii sunt total despiralizați și un nucleu cu asemenea cromozomi de dinoflagelate, total despiralizați apare a conține o superstructură fibrilară ce se aseamănă cu un nucleoid bacterian, păstrând totuși unele zone cu spiralizare reziduală și aspect foarte dens.

6. ACTIVITATEA NUCLEOLARĂ LA DINOFLAGELATE

În nucleul dinoflagelatelor, cea mai evidentă activitate genetică locală este legată de funcția organizator nucleolară. Prezența unuia sau a mai multor nucleoli într-un același nucleu de dinoflagelate este o caracteristică prin care acest grup se aseamănă cu eucariotele tipice și a fost semnalată de către mulți autori (Hollande și colab., 1963; Kubai și Ris, 1969, Soyer, 1969, 1970, 1972; Rae, 1970, Babilot, 1970; Dodge, 1971). La **P. micans** a fost descrisă regiunea organizator nucleolară (Soyer și Haapala, 1974).

Cercetările noastre (Gavrilă și colab., 1983, 1985, 1986) efectuate la **P. micans** au confirmat observațiile lui Soyer și Haapala (1974) și au evidențiat despiralizarea maximă a fibrilelor ADN, la nivelul regiunii organizator nucleolară. În absența histonelor, la dinoflagelate superrăsucirea și despiralizarea fibrelor de ADN rămâne principalul mecanism prin care este reglată funcția genică, altul fiind interrelația acestor fibre cu particulele ribonucleoproteinice (RNP).

În investigațiile noastre, am constatat că în același nucleu de **P. micans** pot exista mai mulți cromozomi organizator-nucleolari care își sincronizează activitatea de sinteză a precursorilor ribozomali prin asocierea regiunilor organizatoare de nucleoli, regiuni care, atunci când sunt activ transcrise, prezintă cel mai mare grad de despiralizare a fibrilelor ADN, comparativ cu restul cromozomului (fig. 10, 11, 12). Tot în cadrul acestor cercetări, au fost identificate structuri nucleolare adiționale, ca semn citologic al amplificării genelor ribozomale.

În ceea ce privește morfologia cromozomilor dinoflagelatelor, analizată cu ajutorul microscopului optic, aceasta variază de la forma de corpuri mici, aproape ovale sau sferice, de 2,5μm diametru, la **Amphidinium carterae** și **Massartia rotundata** la 1μm lățime și 10–20μm lungime, la **Prorocentrum micans.**

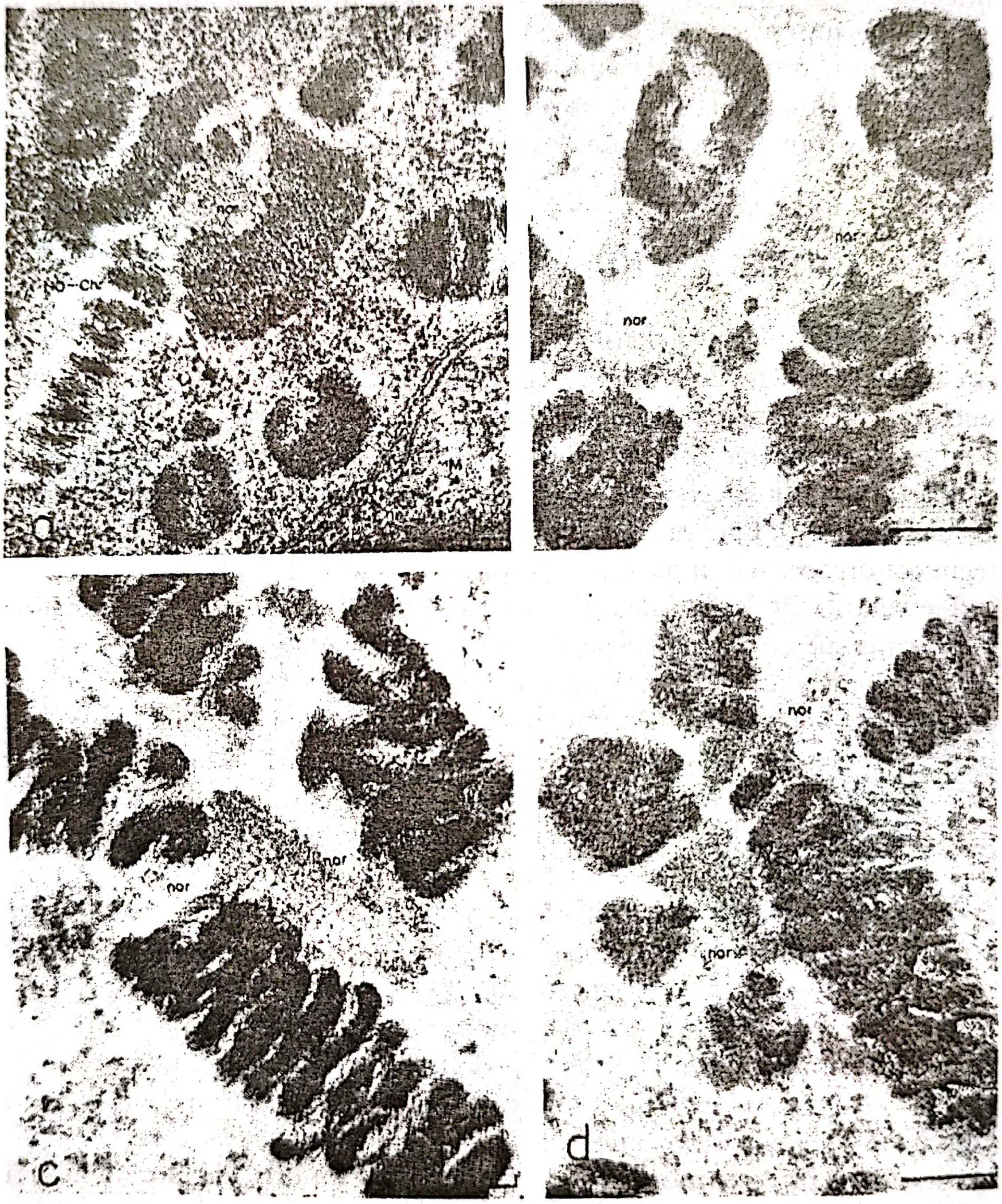

a
NO-Chr
nor
M
nor
nor
c
nor
nor
nor
nor
d

Fig. 10 — Regiunea organizator nucleolară (nor) a cromozomilor organizator nucleolari (NO-chr) la *P. micans*: nu = nucleol; M – mitocondrie. a–d = 74.000. bara = 0,25 µm (după Gavrilă și Mihăescu).

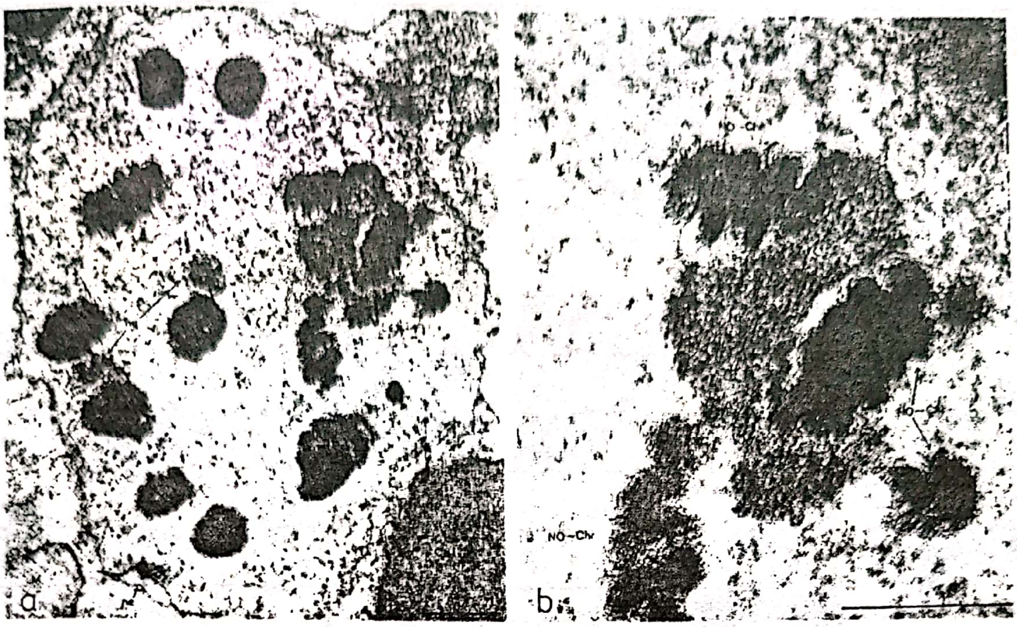


Fig. 11 — Nucleoli multipli și cromozomi organizator nucleolari la *P. micans*. a. un nucleu cu un nucleol mare (nu) și alți doi nucleoli mai mici (săgeți). Chl = cloroplast; M = mitocondrie, No-chr = cromozom organizator nucleolar. a x 37.000; b x 90.000. bara = 0,50 µm (după Gavrilă și Mihăescu).

Numărul de cromozomi pentru câteva specii reprezentative de dinoflagelate este redat în tabelul următor:

Specia	Numărul de cromozomi
Syndinium borgetti	4
Syndiunium sp.	4
Syndinium caryophorum	5
S. turbo	5
S. rostratum	5
Atlantocellodinium tregoubofii	4–5
Cocidinium dubosqui	4–5
Dubosquella sp.	4–5
Hollandella sp.	4–5
Solenodinium sp.	4–5

Specia	Numărul de cromozomi
Merodinium brandtii	5
Merodinium vaenale	6
Merodinium sp.	6
Sphaerita catenata	6–8
Crytiodinium affine	7–8
Leptodiscus medusoides	12
Exuviaella baltica	18–22
E. pusilla	20–25
Amphidinium klebsii	28–34
Exuviaella mariae-lebouriae	30–34
Oxyrrhis marina	40–50
Gymnodinium vitiligo	44
Peridinium trochoideum	44, 80–90
Gymnodinium zachariasii	64
Katodinium rotundatum	64–70
Massartia rotundata	64–70
Prorocentrum micans	65–69
Crypthecodinium (Gyrodinium) cohnii	99–110
Gonyaulax tamarensis	100
Cachonina niei	109–112
Gonyaulax polygama	134–152
Ceratium tripos var. subsala	200
C. hirundinella	264–284

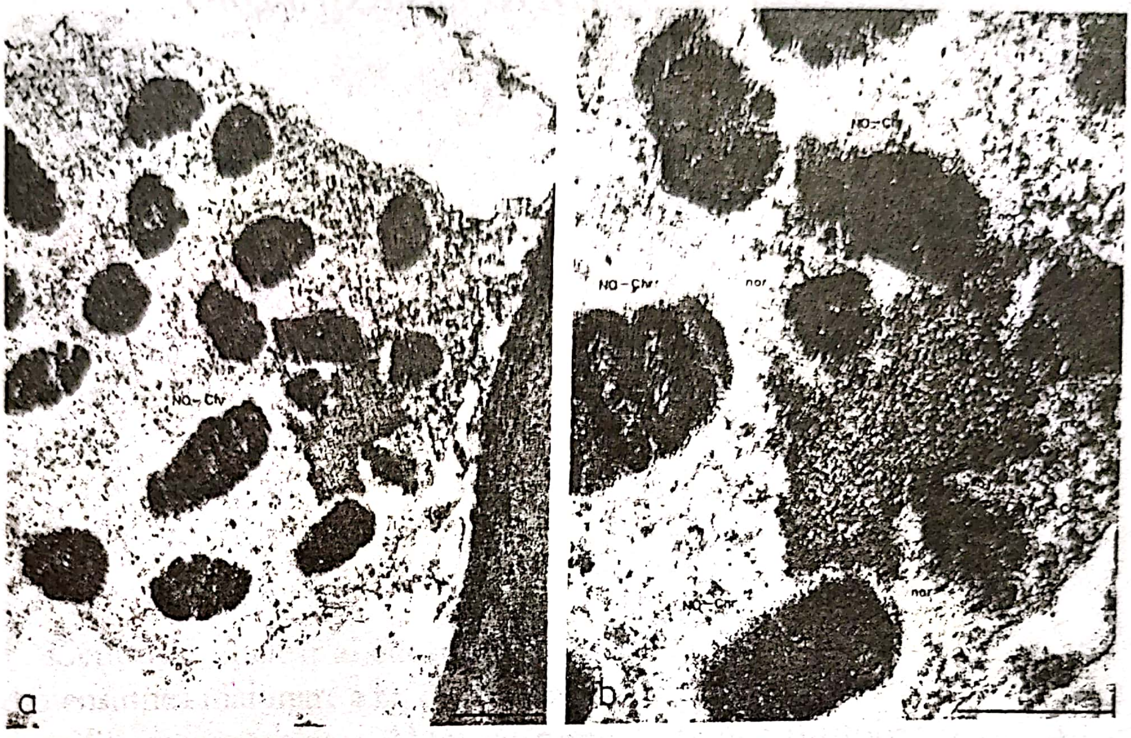


Fig. 12 — Cromozomii organizator nucleolari (No-chr) la *P. micans*
a. aspectul general al unui nucleu, prezentând un nucleol (nu) și mai mulți cromozomi organizator nucleolari x 37.000; b. aceeași imagine x 74.000. bara = 0,50 µm.
chl = cloroplast, nor = regiune organizator nucleolară
(după Gavrilă și Mihăescu, 1986).

CAPITOLUL XXI

ORGANIZAREA GENOMULUI EUCARIOT

1. INTRODUCERE

Genomul nuclear al eucariotelor diferă de genomul procariotelor prin dimensiunea mai mare a sa, conținutul informațional crescut, exces de ADN necodificator, asocierea ADN cu proteine bazice (histone) și compartimentalizare, adică separare față de citoplasmă, fiind încadrat într-un nucleu. Evoluția acestor diferențe a fost, desigur, o precerință pentru diferențierea organismelor pluricelulare.

La eucariote, datorită asocierii ADN cu proteine histonice și repartizării ADN într-un număr mai mare sau mai mic de cromozomi, organizarea genomului îmbracă aspecte complexe. Pentru a discerne diversele nivele de organizare ale ADN asociat cu proteine din cromozomii eucariotelor, este necesar, în primul rând, să se analizeze structura cromozomilor.

Prin genom se înțelege ADN-ul complementului cromozomal haploid în termeni *cantitativi* (cantitatea de ADN) și *calitativi* (totalitatea genelor ce poartă informația ereditară care dirijează toate caracteristicile organismului).

Cantitatea sau conținutul haploid de ADN nuclear, numit și *valoare C*, se exprimă în picograme (10^{-12}g) sau în daltoni. Elementele definitorii ale *calității* genomului sunt: secvența de baze azotate, numărul de secvențe nucleotidice diferite care constituie complexitatea genomului și frecvența sau reiterarea lor.

Conținutul de ADN nuclear prezintă o mare variație, atât în filogenie cât și în ontogenia organismelor superioare. În cursul evoluției, conținutul de ADN al genomului haploid a crescut paralel cu complexitatea evolutivă, dar, în cursul microevoluției, a putut avea loc deopotrivă o creștere și o descreștere a valorii C, cu specificitate de specie. Valorile cantitative ale ADN nuclear în cadrul unui filum sunt foarte variabile datorită apariției secvențelor repetitive, aspect care reprezintă caracteristica generală a ADN eucariot (Britten șiKohne, 1968), variația afectând nu atât numărul de gene, adică secvențele unice codificatoare, cât mai ales, secvențele repetitive, necodificatoare de proteine. La numeroase specii nu există o corelație între valoarea C și complexitatea evolutivă. Acest fenomen poartă numele de *paradoxul valorii C*. De exemplu, peștele *Protopterus* are valoare C de 50pg, urodelul *Amphiuma* de 84 pg, de 28 ori mai mult decât la om , ceea ce nu înseamnă că această specie este mai complexă decât omul. Singura explicație a acestor diferențe rămâne aceea că cel puțin unele specii au mai mult ADN per nucleu decât le este necesar să codifice pentru proteine. Cunoscându-se că mărimea medie a unei gene este de 1.500 perechi de nucleotide, se deduce că numai o mică porțiune din ADN nuclear este reprezentată de gene. Partea variabilă a ADN nuclear este reprezentată de ADN repetitiv. Deci, paradoxul valorii C constă în variația cantității de ADN repetitiv.

2. STRUCTURA CROMOZOMILOR

In structura cromozomilor intră ADN, ARN și două clase importante de proteine: histone și proteine non-histonice.

Histonele împreună cu ADN constituie 2/3 din greutatea cromozomului metafazic, restul de 1/3 fiind reprezentat de proteine non-histonice și ARN ribozomal, rezultat din dezintegrarea nucleolului.

2.1. ADN CROMOZOMAL

La nivelul fiecarei cromatide surori din cromozomul metafazic se află câte un dublu helix ADN care se extinde de la un capăt al cromatidei, prin centromer, până la celălalt capăt.

În medie, o genă este alcătuită din 1000–2000 pb, fagul T4, cu un genom de $2x10^5$ pb (200.000 pb) este compus din 100 gene, iar *Escherichia coli* cu un genom de $4,7x10^6$ pb cuprinde 3000–4000 gene. Prin urmare, la procariote, există o corelație directă între cantitatea de ADN și numărul de gene.

O cu totul altă situație există la eucariote, la care genomul este mult mai complex. Astfel, genomul omului cuprinde $3x10^9$ pb (3 miliarde pb), dar el nu este compus din 3 milioane de gene, ci din mult mai puține și anume: aproximativ 40.000 de gene, după estimările realizate în cadrul Proiectului „Genom uman", încheiat ca secvențiere provizorie, în anul 2001. Această constatare are o singură explicație, aceea că o parte importantă din ADN nu este reprezentată de gene convenționale.

Aceste secvențe de ADN necodificatoare au drept caracteristică structurală, repetabilitatea. Fenomenul constă din existența unei unități de bază alcătuită din câteva zeci, sute sau mii de perechi de baze ce formează un monomer care se repeta de n ori, fie în grupuri (în tandem), fie singur și dispersat în întregul genom.

A 5'—CACGCG CACGCG CACGCG CACGCG—CACGCG CACGCG CACGCG CACGCG—3'

B 5'— CACGCG————CACGCG————CACGCG————CACGCG——3'

Fig. 1 — Repetarea secvențelor de ADN non-informațional A) unitatea de bază (CACGCG) repetată în tandem și tandemurile dispersate în întreg genomul; B) unitatea de bază (CACGCG) singulară, dispersată sub aceasta formă în întreg genomul.

În urma studiilor de cinetica renaturării, s-au propus 4 clase (sau fracții) distincte de ADN analizate în continuare.

2.1.1. SECVENȚE DE ADN ÎNALT REPETITIVE

Secvențe de ADN înalt repetitive sau fracția care renaturează rapid, cu un înalt grad de repetare a bazelor și o complexitate mică. Unitatea repetitivă de bază a unui asemenea ADN este reprezentată cel mai adesea de o secvență ce are o lungime care corespunde doar la câteva nucleotide. În numeroasele cazuri, ADN repetitiv prezintă o secveță de baze ce diferă mult de restul ADN nuclear, astfel încât, atunci când este ultracentrifugat izopicnic, în gradient de CsCl, acest ADN se dispune fie deasupra (fiind mai ușor), fie dedesubtul (fiind mai greu) benzii principale de ADN, constituind ceea ce s-a numit **ADN satelit**. Acesta poate fi bogat în perechi A-T sau G-C.

Secvențele de nucleotide înalt repetate sunt localizate mai ales în heterocromatină la centromer, în regiunile telomerice și constricțiile secundare. Din categoria ADN satelit, o familie de mare importanță genetică este reprezentată de monomerii compuși din zeci de baze înalt repetate, sub formă tandemică, alcătuind **microsateliții**.

Din microsateliții cu o lungime nucleotidică mai mare (**minisateliți**) sunt binecunoscuți așa numiții **VNTR** („*variable copy number tandem repeats*“) a căror unitate de bază are o lungime de 20–50 pb și care se repetă în grupuri de până la 1200 copii. Deoarece numărul de copii din fiecare tandem variază mult în populația oricărei specii, polimorfismul acestor microsateliți poate fi evidențiat și caracterizat prin tehnica amprentei genetice sau amprenta ADN.

În afară de secvențele nucleotidice înalt repetate în tandem, centromerice și telomerice sau ca microsateliți, ADN înalt repetat poate fi și dispersat sau intricat în întreg genomul.

Din categoria ADN înalt repetat, dispersat în întreg genomul fac parte și cele două clase de secvențe denumite: **secvențe scurte intricate — SINE** („*short interspersed elements*“) și **secvențe lungi intricate — LINE** („*long interspersed elements*“).

Pentru clasa SINE este reprezentativă familia de secvențe *Alu* (din genomul uman). Numele Alu derivă din faptul că secvențele din aceste segmente pot fi clivate de o anumită endonuclează denumită Alu I. Familia Alu cuprinde circa 500000 de copii ale unei secvențe de 300 perechi de nucleotide, dispersate în tot genomul și reprezentând circa 5% din ADN total. Studii de secvețiere au stabilit că această unitate de repetiție este un derivat dimeric al ARN 7 SL — un component citoplasmatic al aparatului de traducere asociat reticulului endoplasmic. Repetițiile Alu sunt „retropseudogene“ sau retrotranspozoni, adică un derivat prin inserția în genom a copiilor cADN (ADN complementar) ale ARN celular care a fost prelucrat posttranscripțional. Aceasta este deci un tip de retropozoni nevirali — reprezentați de gene, pseudogene și elemente transpozabile generate de transferul revers de informație genetică. Rozătoarele posedă familii de elemente scurte, intersperse (SINES) înrudite cu suprafamilia B1, reprezentată de derivați monomerici ai ARN 7SL. Este un mister de ce ARN 7 SL a trebuit să dea naștere la un număr așa de mare de retropseudogene la om și la rozătoare, deși prezența unui promotor conservat al ARN polimerazei III în interiorul unității de repetiție poate avea o anumită semnificație. Și la alte specii s-au descris familii SINES derivate din diferite specii de ARN celulare care au fost precursori ARNm, fapt dovedit de prezența cozii 3’-poli(A) și a semnalului de poliadenilare din amonte, întâlnite frecvent, deși produsul genic este obscur.

Din clasa LINE, un membru caracteristic , întâlnit la șoarece, este Kmp, numit mai frecvent L_1. Familia THE_1 numără circa 10^4 copii ale unei inserții de 2–3 kb, având multe caracteristici comune cu provirusul integrat al retrovirusurilor. Membrii acestei familii au lungi repetiții terminale (LTR) de 350 perechi de nucleotide. Distribuția în cromozomi a celor doua clase: LINE și SINE nu este întâmplătoare. Astfel, secvențele SINE, de tipul Alu sunt concentrate în cromozomi în regiunile benzilor G-negative, în timp ce secvențele de tip LINE, cum este L_1, se găsesc în mod permanent în benzile G-pozitive.

Funcția ADN satelit nu este pe deplin cunoscută. Se pare că este implicat în reglarea activității genice și a sintezei ADN, precum și în împerecherea cromozomilor, în recombinare și în segregare.

2.1.2. PALINDROAMELE

Palindroamele sunt secvențe repetate invers sau cu bisimetrie rotatorie (o secvență citită pe o catenă în sensul 3'-5' rămâne aceeași pe catena complementară, cu sensul 5'-3'). In condiții de renaturare, aceste secvențe renaturează rapid, aproape instantaneu și formează pe fiecare catenă structurile caracteristice în formă de ac de păr (Fig. 2).

ADN repetitiv poate lua și forma unor ciclodroame, reprezentând repetiții obișnuite (Thomas, 1973), aranjate în tandem, formând clusteri de 2–20 µm lungime.

Când un asemenea ADN este denaturat și supus condițiilor de renaturare, fiecare catenă se va plia rapid pe ea însăși, spre a forma o buclă de tipul agrafei (hairpin). Asemenea bucle se leagă puternic la hidroxiapatită și pot fi astfel separate de grosul ADN. Această fracție de ADN repetitiv , de tip palindromic, constituie fracția de legare la timpul zero (Nagl, 1978).

După Favel (1980), secvențele palindromice cuprind între 50 și1.500 perechi de nucleotide. Se pare că ele sunt distribuite de-a lungul întregului cromozom, cu excepția telomerelor și a constricțiilor secundare, repetițiile inversate apărând la fiecare 5.000 — 10.000 perechi de nucleotide. În total, secvențele palindromice reprezintă 3–5% din genom, la grâu și 5%, la bumbac.

Secvențele palindromice pot realiza în timpul renaturării structuri complexe, cruciforme, prin împerecheri intracatenare simultane la același nivel și pe ambele catene ale duplexului ADN.

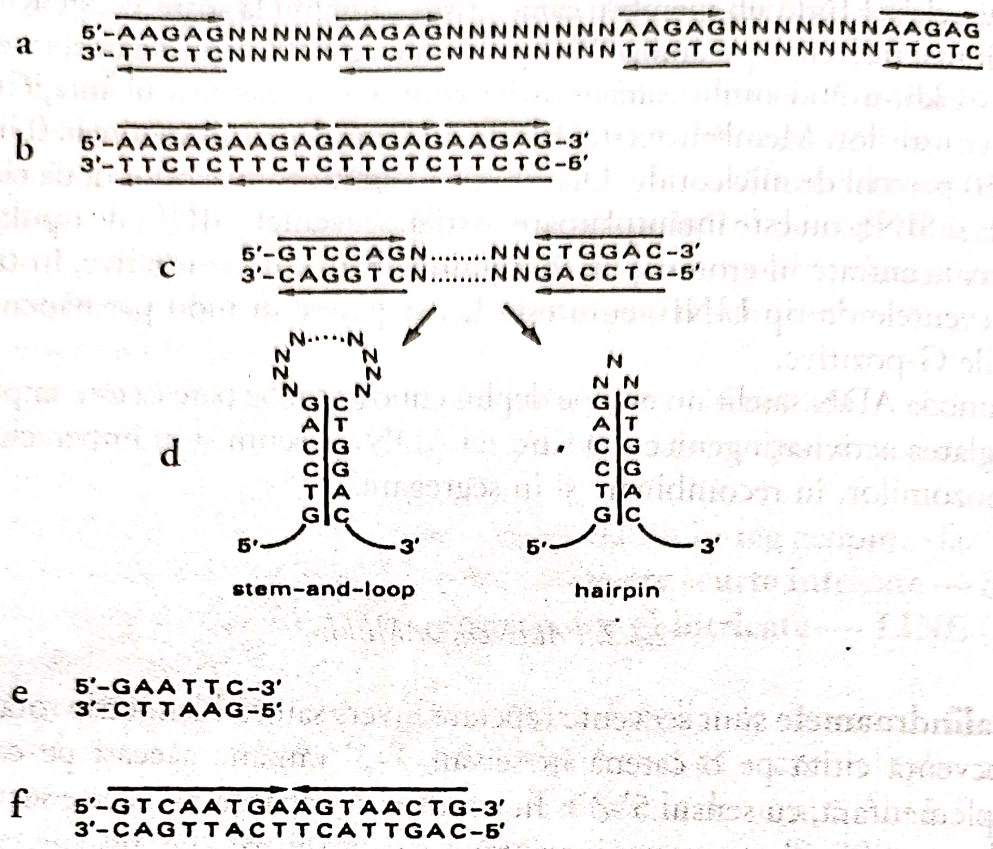

a
5'-AAGAGNNNNNAAGAGNNNNNNNNAAGAGNNNNNNNAAGAG
3'-TTCTCNNNNNTTCTCNNNNNNNNTTCTCNNNNNNNTTCTC
b
5'-AAGAGAAGAGAAGAGAAGAG-3'
3'-TTCTCTTCTCTTCTCTTCTC-5'
c
5'-GTCCAGN........NNCTGGAC-3'
3'-CAGGTCN........NNGACCTG-5'
d
5'
3'
stem-and-loop
hairpin
e
5'-GAATTC-3'
3'-CTTAAG-5'
f
5'-GTCAATGAAGTAACTG-3'
3'-CAGTTACTTCATTGAC-5'

Fig. 2 — Clase de secvențe ADN: a) repetiții directe; b) repetiții directe în tandem; c) *stem*–and-*loop* (tulpină și buclă); d) *hairpin* (agrafă); e) *palindrom*; f) palindrom adevărat.

Al doilea tip de secvențe repetate din ADN eucariot este cel de secvențe repetitive în tandem direct de tip: ACGT ACGT ACGT etc. ceea ce reprezintă o secvență cu repetiție ciclică, directă, denumită și *ciclodrom*, cuprinzând între 600 și 6.000 nucleotide.

2.1.3. SECVENȚE DE ADN MEDIU REPETATE

Secvențe de ADN mediu repetate sunt reprezentate de fracții care variază mult în ceea ce privește gradul de repetiție (10^2 — 10^5) per genom haploid și renaturează cu o rată mai mică decât secvențele de ADN înalt repetate. Unele secvențe de ADN intermediar repetitive reprezintă genele pentru ARNr, ARNt și ARNm pentru histone. Aceste secvențe sunt localizate în eucromatină.

Astfel de secvențe se găsesc în genomul tuturor eucariotelor, cu excepția fungilor, deosebindu-se între ele prin frecvența repetițiilor și prin complexitatea secvențelor.

De asemenea, din categoria secvențelor mediu repetate fac parte secvențele nucleotidice mobile, care se pot deplasa în interiorul genomului, fiind denumite **elemente transpozabile.**

2.1.4. ELEMENTELE GENETICE MOBILE (TRANSPOZABILE)

Elementele genetice mobile sau transpozabile au fost descoperite în anul 1940, de către cercetatoarea americană Barbara McClintock, pe baza unor experiențe efectuate la porumb. Pentru această desoperire, confirmată ulterior la nivel molecular, B. McClintock a primit Premiul Nobel, în anul 1983.

Studiind pigmentarea boabelor de porumb, B. McClintock a ajuns la concluzia că modificările care se observă în pigmentația acestor boabe se datoresc unor elemente genetice mobile care pot circula în cadrul genomului, având posibilitatea de a se insera în interiorul diverselor gene, determinând blocarea sau inactivarea parțială a acestora.

Potrivit concepției Barbarei McClintock, aceste elemente mobile sunt dotate cu informație genetică și, în același timp, cu elemente de control care pot produce un fenotip mutant. Aceste entități genetice săritoare pot determina chiar restructurări cromozomale.

Elementele genetice mobile au fost semnalate atât în genomul procariotelor, cât și în cel al eucariotelor.

In concepția actuală, genele mobile sunt anumite secvențe nucleotidice din genomul procariotelor sau eucariotelor care au abilitatea de a se mișca dintr-un loc în altul în interiorul genomului, purtând informația necesară propriei mobilități sau o informație care depășește această necesitate.

Elementele transpozabile sunt de doua tipuri:

a) secvențe de inserție, notate IS, care sunt relativ mici și nu conțin informație codificată decât pentru a-și asigura funcțiile cerute de migrare. Caracteristica structurală a tuturor secvențelor de inserție este faptul că o astfel de unitate autonomă prezintă la extremități secvențe de baze repetate inversat, ce flanchează o regiune nucleotidică mai lungă, care, de cele mai multe ori, codifică pentru transpozază, o enzimă specifică, implicată în inserția elementului transpozabil. Secvențele de inserție au fost observate numai la procariote.

b) transpozoni (Tn) care includ alături de secvențele de inserție și gene structurale care nu au legătură cu transpozarea. Transpozonii au fost evidențiați atât la procariote cât și la eucariote. Transpozonii sunt unități genetice transpozabile mai complexe decât secvențele de inserție, fiind constituite din mai multe elemente IS (2–3) la care se adaugă gene structurale suplimetare față de cele necesare transpozarii. Elementele IS ale transpozonului vor codifica proteinele necesare activității transpozazice care va asigura inserția prin secvențele terminale inversate, în timp ce regiunea centrală, flancată de IS poartă diverse gene structurale.

Elementele transpozabile — secvențele de inserție și transpozonii — se mobilizează fie prin deplasarea lor ca atare, desprinzându-se din macromolecula de ADN, fie prin copierea unor secvențe de ADN dublu catenar. Prin urmare, transpozarea poate fi conservativă, dar și replicativă.

Prin transpozarea conservativă, elementul transpozabil se deplasează direct de la un loc donator la un loc receptor. Transpozaza este enzima care asigură acest tip de transpozare. Pierderea fragmentului dublu catenar reprezentat de elementul transpozabil, de la locul donator, crează o fractură dublu catenară care va fi rezolvată prin mecanismele de reparare a ADN.

In transpoziția replicativă, elementul transpozabil este reprezentat de o copie a elementului original. Pentru realizarea transpozării replicative sunt necesare 2 condiții:

- transpozarea se poate produce numai în timpul replicării ADN în faza S
- transpozonul trebuie să facă parte dintr-un replicon.

Cu ajutorul unei enzime speciale numită *rezolvaza*, care acționează asupra unei structuri numite *cointegrat*, produsă prin activitatea transpozazei, se obține câte o copie a elementului transpozabil.

Dar, transpoziția replicativă cunoaște și forma de migrare a transpozonilor, reprezentată de copii ribonucleotidice. Este nevoie ca la un moment dat, să se realizeze transcripția într-un ARNm a informației genetice deținută de transpozoni. Transcrierea se realizează cu ajutorul enzimei ARN-polimeraza II, iar moleculele de ARN astfel obținute sunt denumite retropozoni sau retrotranspozoni. Pentru integrarea retrotranspozonilor în genom, este necesară intervenția reverstranscriptazei care transcrie informația genetică a retrotranspozonului pe o catenă de ADN complementară care, după ce este trecută în formă dublu-catenară este integrată în ADN cromozomal, într-un situs anume.

Elementele transpozabile sunt larg răspândite la PK și EK și sunt foarte variate ca structură moleculară. Faptul că s-au conservat în timpul evoluției viețuitoarelor arată că prezența acestor elemente transpozabile constituie un avantaj selectiv. Cu ajutorul transpozonilor se realizează o mai mare plasticitate a organismelor, necesară unei adaptări permanente la mediu. Acest lucru este și mai evident prin capacitatea lor de autoreplicare, datorită autonomiei. Sub influența diferiților factori destabilizatori din mediu se produce o eliberare de transpozoni din locurile de inserție. Elementele transpozabile încep să circule și se reintegrează în genom în alte situsuri decât cele inițiale, ceea ce va asigura o reacție variată a genomului în condițiile unui mediu aflat în permanentă schimbare.

2.1.5. SECVENȚELE UNICE DIN ADN EUCARIOT

Secvențele unice de ADN renaturează ultimele și sunt prezente într-o singură copie în genomul haploid. Aceasta fracție conține cele mai multe dintre gene, dar și secvențe care nu codifică. Secvențele unice sunt localizate în eucromatină. La originea unora dintre secvențele unice stau secvențele repetate, care s-au diversificat prin evoluție divergentă.

2.2. PROTEINELE CROMOZOMALE

ADN este complexat cu doua clase de proteine: histonele și proteinele non-histonice.

2.2.1. HISTONELE

Histonele sunt proteine bazice, bogate în lizină și arginină și au o greutate moleculară cuprinsă între 10.000 și 20.000 daltoni.

Există 5 tipuri de histone cu următoarea nomenclatură:

H_1 — foarte bogată în lizină;

H_{2A} și H_{2B} care au un ușor exces de lizină;

H_3 și H_4 care sunt bogate în arginină.

Funcția histonelor constă în:

-menținerea integrității structurale a cromozomului;

-protejarea ADN de acțiunea deoxiribonucleazelor;

- sunt factori de reglare ai activității genice.

Conținutul histonelor în aminoacizi bazici (arginină, lizină, histidină), purtători de sarcini pozitive, explică legarea lor la ADN. Aceasta se realizează prin formarea de punți ionice (electrostatice) între grupele fosfat încărcate negativ ale ADN și grupele amino (NH_2) încărcate pozitiv ale catenelor laterale ale aminoacizilor bazici din catena polipeptidică a histonelor. Astfel, lizina se leagă preferențial la perechile A-T, în timp ce arginina se leagă preferențial la perechile G-C. Aceste legături se realizează la nivelul adânciturii mari, în timp ce adâncitura mică prezintă situsuri de recunoaștere pentru ARN-polimerază.

Componența bazică a histonelor protejează ADN de denaturarea termică. Acest rol îl îndeplinesc cationii care reduc forțele de repulsie ce apar între grupările fosfat cu sarcini negative. Temperatura de denaturare termică a ADN este în funcție de concentrația cationică a moleculelor de histone, acestea fiind policationi.

2.2.2. PROTEINELE NON-HISTONICE

Proteinele non-histonice reprezintă un grup heterogen de polipeptide:
- enzimele implicate în sinteza ADN și ARN, precum și în repararea ADN, cum sunt ARN-polimerazele, ADN- polimerazele, histonacetilazele, nucleozidtrifosfatazele, fosfatazele, helicazele, topoizomerazele, ligazele; - proteinele reglatoare de tipul factorilor de transcripție; - proteinele structurale precum actina, tubulina, etc.

În timp ce histonele și ADN sunt constituienți permanenți ai nucleului, proteinele cromozomale nonhistonice sunt, cel puțin pentru unele, pasageri în flux continuu între nucleu și citoplasmă.

Eucromatina este mai bogată în nonhistone decât heterocromatina, iar regiunile active transcripțional, de asemenea, mai bogate decât cele inactive; cantități mici de nonhistone se găsesc însă și în cromozomii mitotici și meiotici.

Spre deosebire de histone, nonhistonele au specificitate de specie și de țesut. Ele pot fi corelate cantitativ și calitativ cu intensitatea proceselor metabolice și cu stadiul ciclului celular.

Sinteza proteinelor nonhistonice are loc în nuclei pe tot parcursul ciclului celular, atingând maximum la sfârșitul fazei G1 și minimum în faza S.

Unele proteine non-histonice au rol structural, participând la organizarea cromatinei. De asemenea, prin procesele de fosforilare și defosforilare, proteinele nonhistonice îndeplinesc rolul de molecule reglatoare ale activității genice. Proteinele nonhistonice intervin în următoarele procese: în diferențierea celulară (sunt mai abundente în celulele în curs de diferențiere decât în celulele diferențiate); în stimularea transcrierii genelor pentru histone, concomitent cu sinteza ADN; în activarea genelor care codifică sinteza macromoleculelor esențiale pentru replicarea ADN și defășurarea mitozei.

2.3. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC ÎN CROMOZOMII METAFAZICI.

2.3.1. GENERALITĂȚI

Problema esențială a organizării materialului genetic în cromozomi este aceea a modului în care este organizată molecula de ADN dublu helicoidală în nucleii interfazici și în cromozomi.

Molecula ADN este asociată cu proteine histonice, care stabilizează duplexul ADN , induc o structură terțiară și limitează acțiunea enzimelor asupra ADN. Molecula ADN desfășurată și necomplexată cu histone este foarte mare, astfel ca există un model perfect de împachetare a fibrei ADN, atât din punctul de vedere al organizării, cât și din punct de vedere funcțional. Plierea moleculei ADN în nucleu și cromozom nu este întâmplatoare, ci se corelează direct cu activitatea genică a diferitelor sale regiuni. De fapt, materialul genetic activ în nucleu este cromatina și nu macromolecula ADN singură. ADN conține informația genetică ce nu poate fi exprimată fără participarea proteinelor cromozomale și a diferitelor tipuri de ARN. Maniera în care o regiune a genomului este împachetată la un moment dat al ciclului celular sau într-un anumit tip de celulă determină dacă genele sunt active sau nu, în acea regiune. Condensarea moleculei ADN în cromozomi reflectă așadar, activitatea genetică intrinsecă a ADN.

Pe măsură ce s-a pătruns tot mai adânc în structura genomului eucariotelor, s-a constatat că se disting mai multe nivele structurale și de organizare, unele dintre ele insuficient cunoscute și până în prezent. Cele mai bine cunoscute sunt cel al moleculei ADN (dublul helix) și nivelul de organizare reprezentat de cromatida cromozomului metafazic. Între aceste

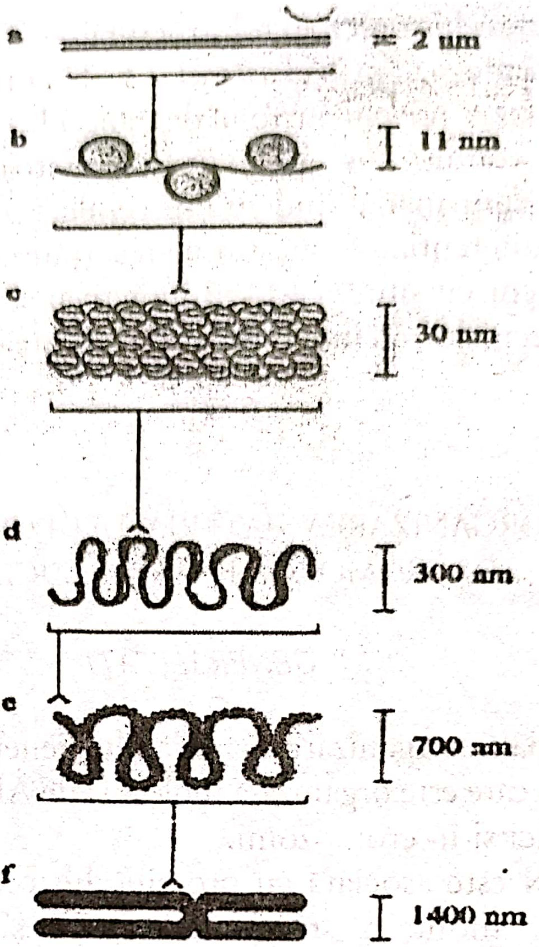


Fig. 3 — Stadiile de condensare a ADN (a) și a cromatinei (b-e) în formarea cromozomului metafazic (f) (după Alberts și colab., 1983).

două extreme de organizare genomică, s-au mai distins alte trei nivele: fibra nucleozomală, solenoidul și domeniile buclate.

2.3.2. *FIBRA NUCLEOZOMALĂ*

Fibra nucleozomală este prima etapă de împachetare a macromoleculei ADN. Nucleozomul este elementul principal al fibrei.

În anul 1974, cercetătorii A.L. Olins și D.E. Olins au observat că structura de bază a materialului cromatidelor cromozomilor este reprezentat de un lanț moniliform, alcătuit din corpusculi cu diametrul de 7–11 nm, uniți între ei prin filamente liniare de ADN, pe care i-au denumit corpuri nucleare sau „*nubodies*“. Acești corpusculi, constituiți din ADN și histone,

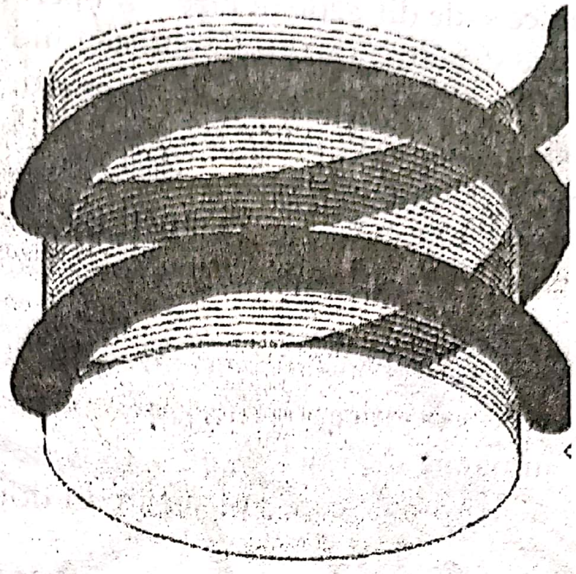


Fig. 4 — Corp nucleosomal alcătuit din octamerul histonic și cele aproape două tururi helicale de duplex ADN ce înfășoară miezul nuclosomal (după Lewin, 2000).

au fost denumiți ulterior, de către Kornberg, *nucleosomi*. Un nucleosom este alcătuit dintr-un octamer histonic în care intră în cantități egale fracțiile histonice: H_{2A}, H_{2B}, H_3 și H_4, dar fiecare în cantitate dublă. Octamerul histonic se asociază cu ADN dublu helicoidal, cu o lungime de 146 perechi de nucleotide. Octamerul este probabil stabilizat în urma interacțiunii capetelor C- terminale hidrofobice ale histonelor care, fiind globulare, se ancorează spre a constitui partea centrală a octamerului, pe când capetele N-terminale, bogate în arginină și lizină, rămân la periferie, sub forma unor cozi care interacționează cu ADN și se înfășoară în jurul miezului pe aproape două (1 și 3/4) tururi superhelicale negative. Fiecare corp nucleozomal este legat de următorul printr-o secvență de ADN dublu helicoidal, lungă de aproximativ 60 nucleotide. Acest filament de legătură se numește *ADN-linker* și, împreună cu histona H_1 formează legătura inter-nucleozomală.

Obținerea în stare microcristalină a particulelor nucleozomale — miez nucleosomic, ce conțin 146 perechi de baze ADN a permis apoi cristalizarea acestora. În condiții de cristalizare, nucleosomii se agregă, spre a da forme de arc și forme cilindrice, acestea de pe urmă conținând nucleosomi într-un aranjament helical. Studiile electronomicroscopice au relevat că în toate aceste forme, nucleosomii apar sub formă de pană (de crăpat lemne) sau de cilindru, de circa 57 Å înălțime și 110 Å diametru. Studiile electronomicroscopice și de difracție în raze X au permis lui Finch și Klug (1977) să interpreteze structura nuclosomului ca fiind asemănătoare unui disc plat de 110 x 110 x 57 Å divizat în două structuri. Acesta este *modelul **platisomului***. Olins (1978) redă imaginea de asamblu a nucleosomului. Acesta are un înveliș exterior bogat în ADN asociat cu porțiunile N-terminale ale celor 8 molecule de histonă, porțiuni simetric răsucite și un miez proteinic intern format din porțiunile globulare ale acestor histone, strâns împachetate.

Structura bipartită a nucleosomului este dovedită de studii electronomicroscopice, în condiții specifice, nucleosomul putând fi divizat în două părți simetrice — jumătăți de nucleosom , deși nu este dovedită încă existența unei axe nucleosomale care să-l separe în două arii simetrice.

Studiile de reconstituire de cromatină în care s-au folosit cele patru fracții histonice în diferite combinații, cu omiterea unora sau altora dintre cele patru tipuri de histone ce constituie miezul nucleosomic au condus la obținerea unor date care confirmă aranjamentul stabilit al histonelor în alcătuirea nucleosomilor.

Folosindu-se ADN provenit de la virusul SV 40, s-au obținut particule reconstituite cu înfățișarea caracteristică nucleosomilor nativi, de formă sferică, cu un diametru de circa 125Å și cu un coeficient de sedimentare de 11 S, comportându-se la atacul nucleazelor asemănător cromatinei eucariote native.

Nici o combinație de histone nu se poate realiza atunci când se omit histonele H_3 și H_4, cel mai puternic asociindu-se histonele bogate în arginină, tocmai cele a căror secvență de aminoacizi a fost puternic conservată în decursul evoluției.

Octamerul histonic cordiform formează miezul nucleosomic cu simetrie diadică.

Dublul helix ADN se comportă la nivelul nucleosomului ca o baghetă rigidă, el fiind stabilizat prin repulsia încărcăturilor negative de-a lungul coloanei glucido-fosforice, având loc cel mult o pliere ușoară a duplexului ADN în înfășurarea sa pe miezul nucleosomic. Aceasta deoarece, ramificațiile laterale cu aminoacizi bazici ale brațelor N-terminale ale histonelor tind să neutralizeze încărcăturile negative ale grupelor fosfat.

Interacțiunile histonă-ADN implică preferențial adâncitura majoră a dublului helix. Toate histonele cu excepția H_1 se leagă și neutralizează sarcinile negative numai pe o parte a dublului helix ADN, pe partea opusă

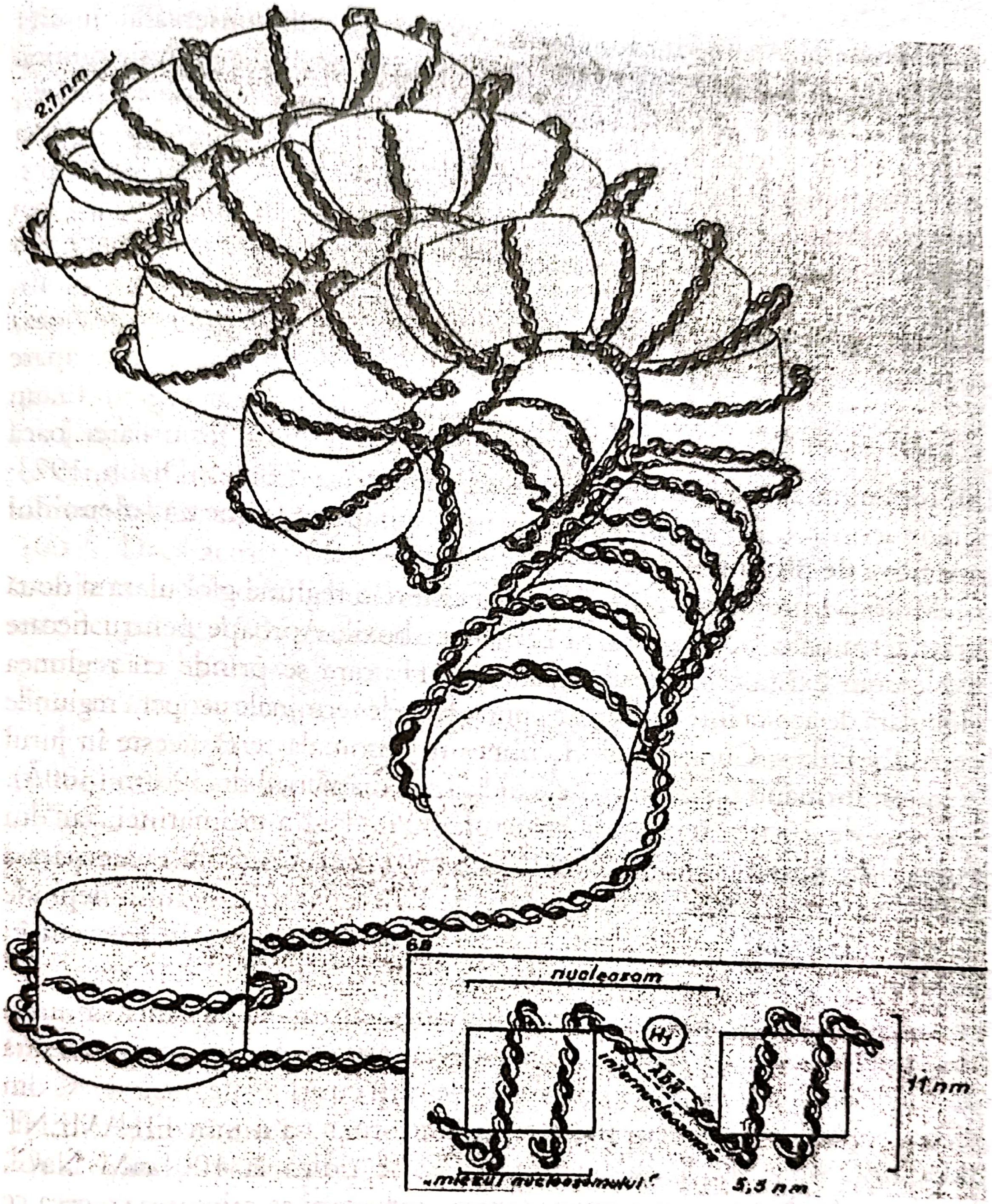

27 nm
6B
nucleosom
H1
ADN
internucleosomal
11 nm
„miezul nucleosomului"
5,5 nm

Fig. 5 — Reprezentarea actuală a fibrei supraspiralizate de cromatină (modelul nucleosomal) în care, miezul nucleosomal este considerat octamerul histonic plus segmentul de ADN asociat lui, iar nucleosomul este considerat miezul nucleosomal plus segmentul ADN linker (internucleosomal) asociat cu H1 (după Bradbury, 1978).

fiind încă prezente repulsii de aceeași sarcină, permițând astfel plierea ADN în jurul miezului histonic.

Histona H_2A se poate conjuga cu o proteină înalt conservată, numită ubiquitină, printr-o legătură între lizina din poziția 119 a H_2A și arginina de la capătul C terminal al ubiquitinei, rezultând complexul molecular H_{24} care poate participa în locul H_2A la alcătuirea nucleosomului. Forma nucleosomului este de cilindru turtit din care cauză s-a numit **platisom**. Nucleosomul prezintă o bisimetrie a octamerului histonic, acesta putându-se plia în două jumătăți. Segmentul de ADN care înconjură nucleosomul este pliat la circa 1/7 din lungimea sa, formând o superspirală, reprezentând structura terțiară a ADN, iar prin spiralizare ulterioară (superhelix) rezultă structura cutaernară a fibrei de cromatină care apare cu aspect moniliform, adică, precum mărgelele înșirate pe ață. (fig. 9) (Braun și col., 1975). Histona H_1 prin gradul și situsul său de fosforilare, joacă un rol dominant în controlul structurii cuaternare (Louie șiDixon, 1973; Bradbury și col. 1974) Fibra de cromatină spiralizată formează **solenoidul** sau **fibra de 30 nm.**

Molecula proteinică H_1 este formată dintr-o regiune globulară și două brațe terminale, unul amino și celălalt carboxil. Aproape pentru fiecare nucleosom există o moleculă proteinică H_1 care se prinde cu regiunea globulară de acesta într-un singur punct. Brațele terminale acoperă regiunile de ADN-linker. Cu ajutorul H_1 fibra nucleosomală se răsucește în jurul ei însăși, formând o structură helicoidală, cu diametrul de 30 nm (300Å).

Fibra de 30 nm reprezintă structura secundară a cromatinei, iar din punctul de vedere al răsucirii ADN, ea reprezintă structura cuaternară a ADN sau stadiul de super-superrăsucire. Formarea solenoidului depinde de prezența cationilor bivalenți și acest tip de fibră este găsit frecvent în interfază și în mitoză.

Dacă cromatina intactă care conține toate histonele este menținută la concentrația scăzută de săruri (1mM NaCl) aceasta se prezintă ca o structură destul de deschisă, cu nucleosomi bine definiți cu ADN ce intră și iese din direcții opuse la un același punct. Această formă s-a numit FILAMENT NUCLEOSOMAL. Dacă puterea ionică se ridică la 100 mM NaCl, lungimea ADN spacer sau linker dintre nuclosomi se micșorează, ceea ce conduce la apariția unei configurații mai dense, cu nucleosomi dispuși într-un aranjament în zig-zag, și această formă s-a numit FIBRA UNITATE. Creșterea în continuare a puterii ionice și, mai ales cu adăugarea unor mici cantități de ioni bivalenți (Mg^{2+}) face ca fibra de 100 Å să se spiralizeze, spre a produce o fibră groasă de 300 Å. S-au propus numeroase modele pentru arhitectura moleculară a fibrei de 300 Å. Pe baza analizei electronomicroscopice, potrivit unuia dintre aceste modele, elaborate de

Finch și Klug (1976), fibra de 100 Å se spiralizează într-o structură helicală care conține 3–6 nuclosomi per tur, depinzând de concentrația salină. Această structură spiralată se numește **superhelix** sau **solenoid**, având un diametru de 250 - 300Å, cu o înălțime a pasului de 110 Å. Helixul poate avea atât sens dextral, cât și sens senestral. În cadrul solenoidului, nucleosomii sunt ațezați astfel că histonele H_1 sunt dispuse în centrul helixului solenoidal, în strâns contact unele cu altele, interacțiunile H_1–H_1 fiind mult mai importante pentru stabilitatea solenoidului decât contactele individuale nucleosom-nucleosom. ADN ce leagă nucleosomii (ADN linker) nu este un factor esențial de stabilizare pentru structura solenoidală, de vreme ce particulele nucleosomale izolate pot constitui structuri solenoidale.

După un alt model, elaborat recent pentru structura fibrei de 300 Å, se consideră că unitatea de repetiție nu este un nucleosom ca în modelul solenoidal, ci mai curând un dimer de două plieri în zig-zag ale fibrei de 100 Å. Dacă această fibră este pliată de-a lungul axei sale, se produce un aranjament cilindric helical, cu diametrul de 250 — 300 Å, al cărui centru este ocupat de ADN spațiator condensat. O adâncitură dispusă de-a lungul periferiei helixului va fi potrivită spre a adăposti histona H_1, care are rolul de a stabiliza structura.

Este clar că diferența între cele două modele de organizare constă în faptul că în modelul solenoidului histona H_1 este localizată în centrul structurii helicale, pe când în modelul fibrei încolăcite de 100Å, localizarea acesteia este periferică. Deocamdată, nu există date experimentale care să tranșeze în favoarea vreuneia dintre aceste ipoteze, în ceea ce privește localizarea histonei H_1.

Cercetările lui Laskey și colab. (1978) au condus la izolarea și purificarea unei proteine acide din ovule nefecundate de *Xenopus laevis* care intervine în asamblarea fracțiilor histonice în structuri nucleosomale. Această proteină acidă, termostabilă, are o greutate moleculară 29.000 daltoni. Ea leagă fracțiile histonice în complexe nucleosomale, după care le transferă la ADN, atunci când experimental se realizează asamblarea în sisteme acelulare.

Etapa urmatoare de condensare a fibrei de cromatină este reprezentată de domeniile buclate ale ADN, rezultate din condensarea fibrei solenoidice. Buclele prezintă la baza lor secvențe specifice care se asociază cu un schelet de susținere alcătuit din proteine non-histonice numit **scaffold** sau **eșafod** cromozomal. Componentul principal al acestora este reprezentat de topoizomerazele II, grup de enzime care realizează suprarăsucirea ADN.

Buclele sau domeniile buclate se comportă ca unități de replicare (repliconi) însă pot conține câteva unități mici de transcripție.

Cercetările lui B. A. Hamkalo și colaboratorii (1981) au evidențiat în nucleii interfazici și cromozomi o distribuție neuniformă a nucleosomilor în fibra de 300 Å, rezultând domenii structural-funcționale discrete, diferitele „pachete" nucleosomale fiind legate de îndeplinirea unor anumite funcții ale diferiților loci, rezultând bucle cromatice, reprezentând suportul structural pentru funcționarea diferitelor gene.

T. A. Okada și D. E. Comings (1979) au evidențiat o organizare de ordin superior a fibrei unitate de cromatină în cromozomul metafazic, pe care au numit-o **organizare în rozete și interrozete.** Serii regulate de rozete sunt interconectate prin sectoare de ADN liniar interrozetal. La nivelul rozetei se află circa 20 bucle ADN. Rozetele pot fi comparate cu cromomerele cromozomilor politeni.

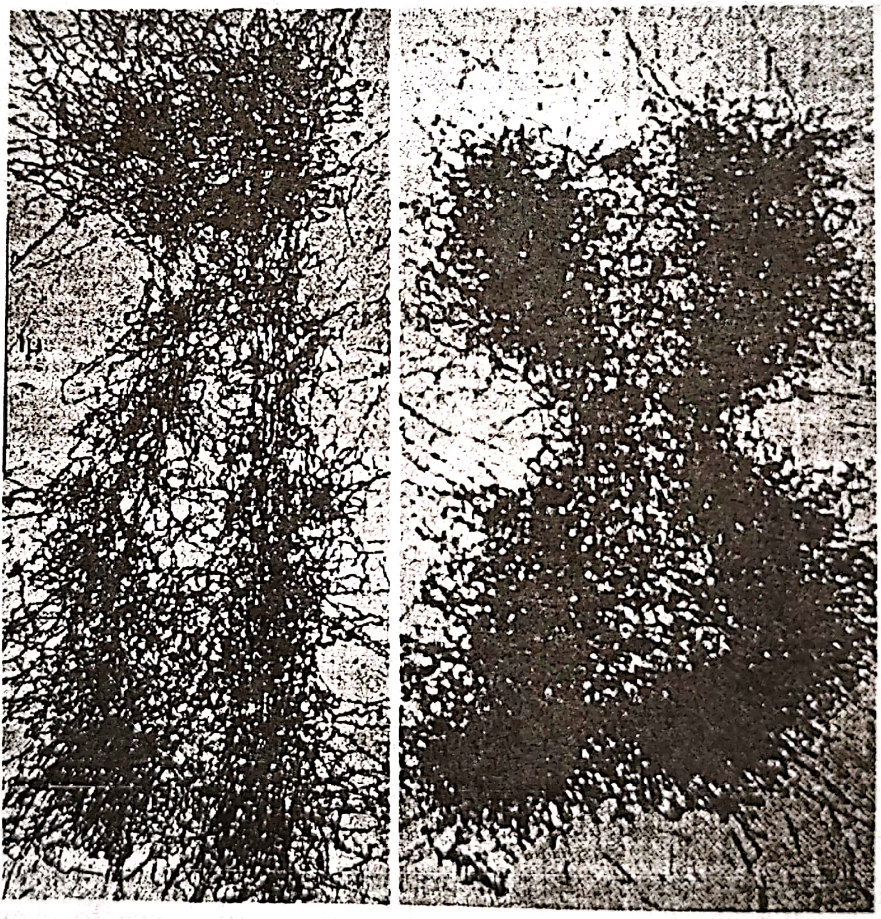


Fig. 6 — Imaginea electronomicroscopică a preparatelor totale de cromozomi umani împrăștiați pe suprafața apei distilate. Sunt clare fibrele de cromatină pliate în bucle neregulate, multe fiind proiectate în afara cromatidelor surori (după G. Bahr, din Schwarzacher, 1976). Bara = 1μm.

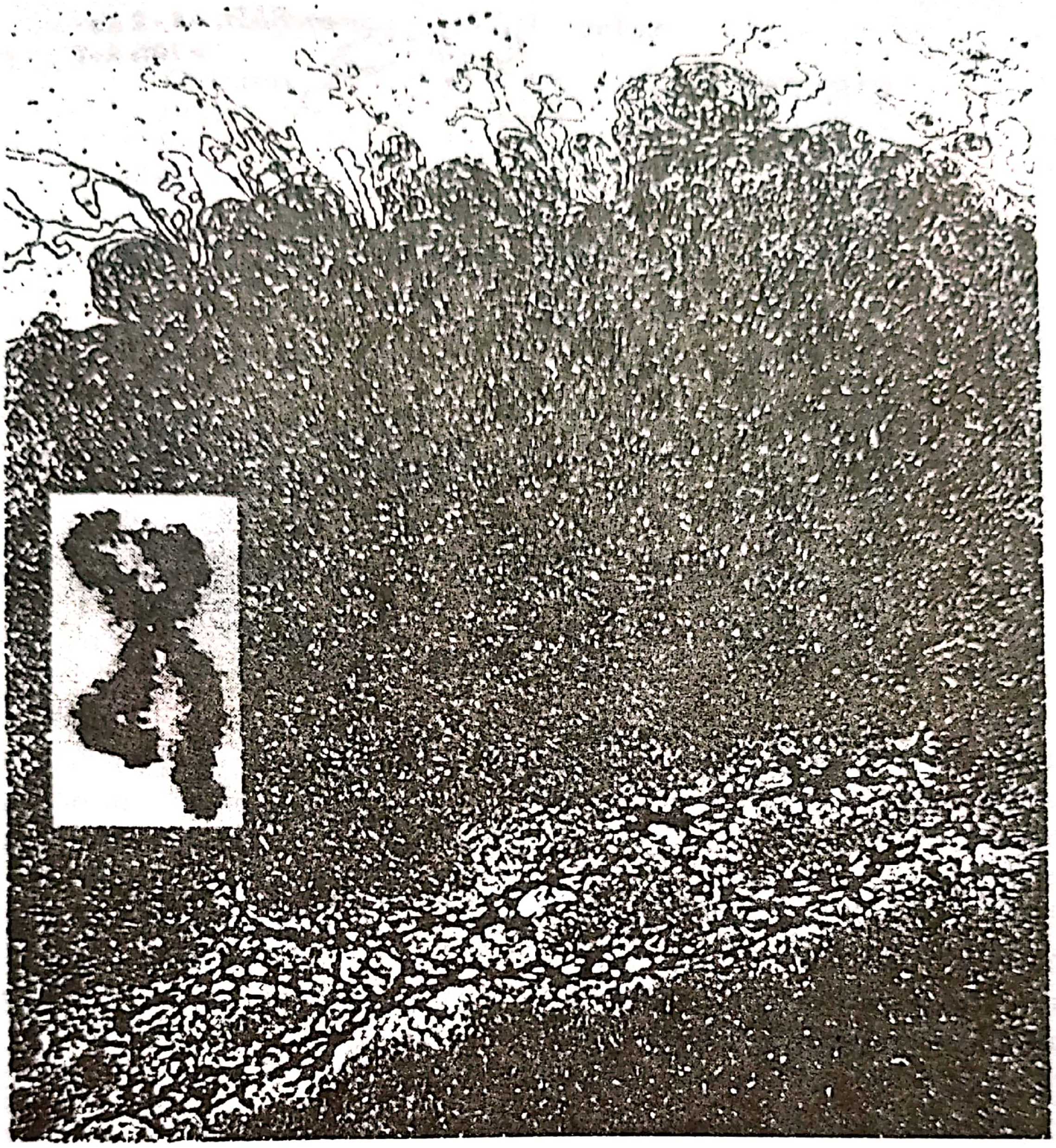


Fig. 7 — *Scaffold*-ul cromozomal evidențiat de Laemmli și colaboratorii (din Lewin, 1993).

Cercetările lui Wray și Laemmli (1978) conduc la concluzia că organizarea cromatinei în cromozomul metafazic se bazează pe o rețea de proteine nonhistonice care constituie un veritabil schelet (*scaffold*) ce are exact forma cromozomului metafazic (fig. 6, 7).

Acești autori au arătat că după extragerea lentă a histonelor, rămâne un matrix proteinic alcătuit din nonhistone, matrix care are morfologia generală

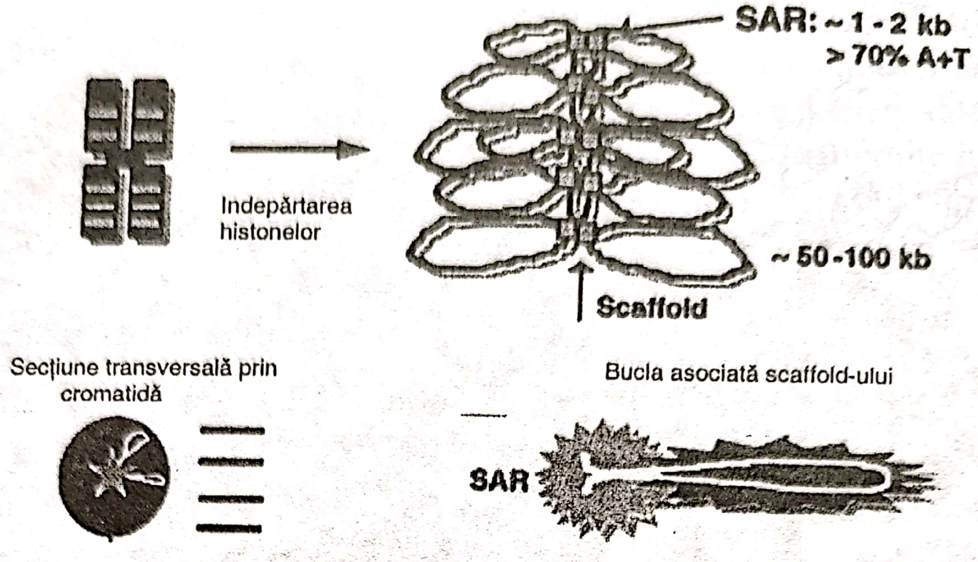

SAR: ~ 1 - 2 kb
> 70% A+T
Indepărtarea histonelor
~ 50 - 100 kb
Scaffold
Secţiune transversală prin cromatidă
Bucla asociată scaffold-ului
SAR

Fig. 8 — Reprezentarea schematică a scaffold-ului cromozomal şi a SAR-urilor (www.molbio.unige.ch) (Depatamentul de Biologie moleculară al Universităţii din Geneva).

a cromozomului metafazic. Aceasta înseamnă că ADN este replicat în cromozomi sub formă de bucle, menţinute de proteine încă necunoscute, histonele determinând diferite stări structurale ale buclelor ADN, prin modificarea chimică a lor, sub acţiunea unor enzime specifice.

În stare funcţională, buclele nu sunt complet desprinse de scheletul proteinic, existând secvenţe specifice recunoscute de topoizomeraza II, asociate cu matricea proteinică (sau regiuni de ataşare la schelet — ***scaffold associated regions SAR)***. (Fig. 8).

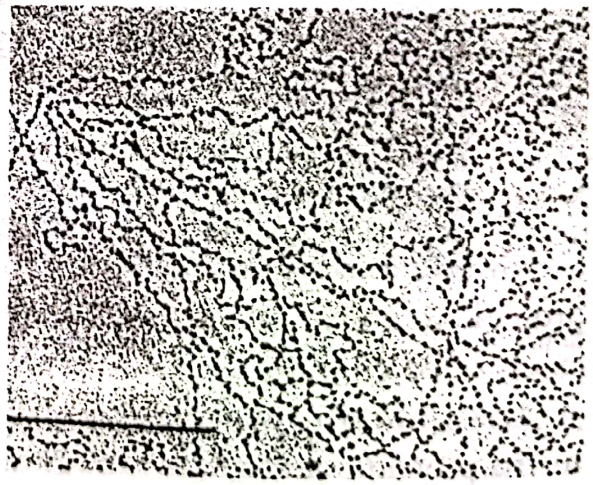


Fig. 9 — Nucleosomi în cromatina nucleului eritrocitului de pasăre, vizualizaţi în TEM (microscopia electronică de transmisie). Cromatina a fost împrăştiată pe un substrat hidrofilic, în condiţii ionice scăzute, după metoda Miller (după Mc Knight S. L. şi O. L. Miller Jr, 1976) Bara = 1 µm.

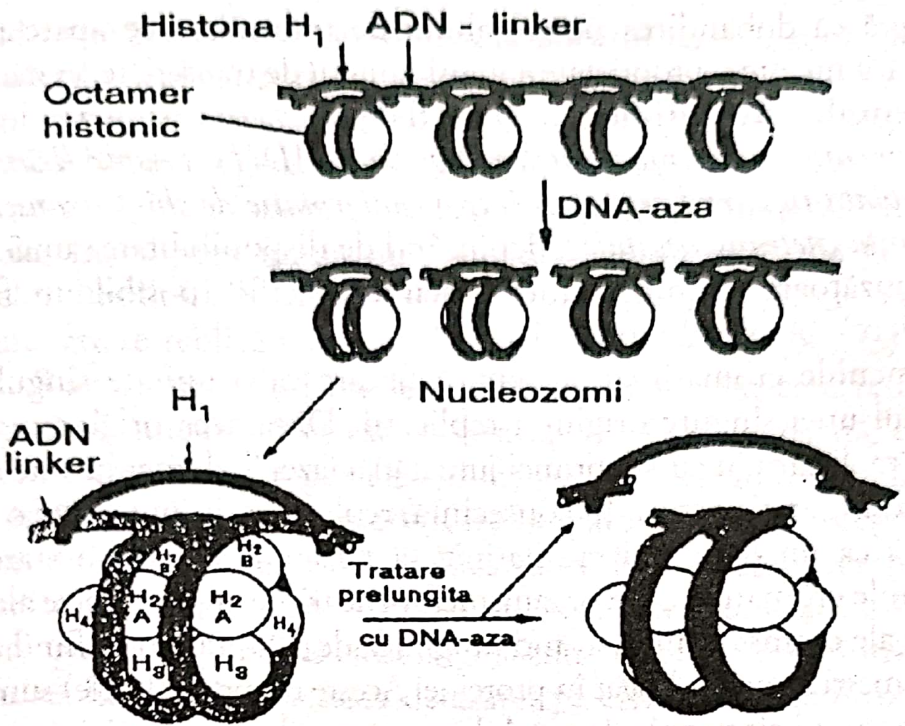

Histona H_1
ADN - linker
Octamer histonic
DNA-aza
Nucleozomi
H_1
ADN linker
H_2 B
H_2 B
H_2 A
H_2 A
H_4
H_4
H_3
H_3
Tratare prelungita
cu DNA-aza

Fig. 10 — Organizarea fibrei de cromatină, a nucleosomului și a particulei miez nucleosomale (www.molbio.unige.ch) (Depatamentul de Biologie moleculară al Universității din Geneva).

Matrixul proteinic este dezorganizat în urma tratamentului moderat cu tripsină. Analiza electroforetică a produșilor acestei digestii enzimatice a evidențiat existența a peste 30 de fracții de proteine nonhistonice.

Domeniile buclate cu diametrul de 300 nm se pliază și se condensează pentru a forma ultimul nivel de organizare: cromatida cromozomală de 700 nm în diametru. (Fig.3)

2.4. DOMENIILE CROMATINICE

Goldman (1988) a introdus noțiunile de gene **„competente transcripțional"**, înțelegând prin acest termen setul de gene care sunt transcrise la un moment dat sau care vor fi transcrise ulterior, în dezvoltarea ontogenetică, atunci când vor apare stimuli corespunzători, și de gene **„incompetente transcripțional"**- acele gene care nu pot fi transcrise în nici o situație mezologică. De exemplu, gene incompetente transcripțional în fibroblaste sunt genele pentru hemoglobină sau genele specifice ficatului. Autorul consideră că dobândirea potențialului de transcriere ce apare în cursul dezvoltării nu este o proprietate a însăși unității de transcriere, ci mai degrabă a **domeniului cromatinic** care poate fi de câteva ori mai mare decât gena. *Prin domeniu cromatinic se înțelege o buclă de ADN superspiralizată ce poate fi asamblată în cursul replicării într-o conformație deschisă (transcriptibilă) sau închisă (netranscriptibilă)*, depinzând de disponibilitatea unei cantități corespunzătoare a unui factor proteinic specific (posibil un factor de transcriere), în cursul replicării.

Domeniile cromatinice se replică fiecare ca o unitate singulară, sub controlul unei singure origini a replicării. Dacă acea origine a replicării inițiază replicarea în cursul primei jumătăți a fazei S, domeniul este asamblat într-o configurație activă. În consecință, replicarea timpurie este o condiție esențială ca un domeniu cromatinic să fie asamblat într-o stare activă. Domeniile cromatinice ale organismelor eucariote apar ca bucle ale regiuni discrete ale cromozomilor, având lungimea de 30–300Kb și, fiind ancorate într-un matrix nuclear bogat în proteine. Aceste domenii (bucle) sunt vizibile la microscopul electronic, la nivelul cromozomilor metafazici, iar existența lor în cromatina interfazică poate fi dedusă din date biofizice și de microscopie de fluorescență a nucleilor interfazici.

Domeniile sau buclele cromatinice se comportă ca unități, în multe privințe, deși ele pot conține mai multe unități de transcripție, discrete. În primul rând, ele apar a fi unități independente de replicare. Microscopia electronică a evidențiat o singură bifurcație de replicare pe buclă, existând o corelație clară între dimensiunea buclelor interfazice (domeniilor cromatinice) și dimensiunea unității de replicare (repliconul).

Domeniile cromatinice funcționale apar ca regiuni de 30–330 Kb, prezentând sensibilitate crescută la concentrații mari de endonuclează, cum ar fi DNaza I, în tipurile de celule unde genele sunt exprimate, ceea ce sugerează că ele sunt realmente regiuni transcriptibile ale cromatinei.

Fiecare domeniu cromatinic este o unitate funcțională, în sensul că, bucla în intregul ei poate fi în stare potențial activă sau în stare represată transcripțional.

La mamifere, benzile G clare din cromozomi sunt replicate în faza S timpurie, pe când benzile G întunecate se replică în a doua jumătate a fazei S. Sunt date clare potrivit cărora genele vitale sunt cantonate în benzile G clare. Genele „*housekeeping*“ (de întreținere) care sunt ubicvitar exprimate, sunt localizate în regiuni cromozomale cu replicare timpurie, la începutul fazei S. Există deci o corelație clară între exprimarea genică și replicarea timpurie. Toate genele exprimate sunt replicate în prima jumătate a fazei

S, pe când toate genele replicate tardiv, la sfârșitul fazei S, sunt silențiate transcripțional. Replicarea timpurie este o condiție necesară, nu însă și suficientă, în expresia genică. Genele β-globinei, imunoglobulinelor, actinei din mușchii scheletici și gena N-myc se replică timpuriu, în țesuturile unde aceste gene sunt funcționale, și tardiv, în țesuturile unde ele nu sunt funcționale. Inactivarea unuia din cei doi cromozomi X de la femela mamiferelor implică silențierea transcripțională a genelor de pe acest cromozom care se replică tardiv. Substanța 5–azacitidina (5–AC) inhibă metilarea. S-au obținut linii celulare hibride șoarece-om care rețin doar cromozomul X uman, inactivat. Folosind 5–AC se constată că prin submetilare este reactivată gena Hprt de pe acest cromozom inactivat. Aceasta este asociată cu o modificare a pattern-ului de replicare a cromozomului X inactivat, de la replicarea tardivă la replicarea precoce, dar această modificare nu se extinde la nivelul întregului cromozom. O bandă citologică corespunde la circa 20 repliconi. S-a dovedit că, într-adevăr, un singur replicon suferă această defazare, pe când restul repliconilor se comportă precum cluster-ul repliconic.

Reglarea transcripției genice implică două etape de bază:

1. Stabilirea unei conformații a cromatinei compatibilă cu transcripția;
2. Introducerea factorilor transactivatori care interacționează cu promotorul, spre a iniția transcripția.

Replicarea timpurie poate constitui un mecanism general de asigurare a asamblării domeniilor cromatinice transcripțional competente ale cromatinei și cromozomilor la mamifere.

În determinarea structurii cromatinei la nivelul unui domeniu al cromatinei funcționează un centru de organizare care reprezintă o secvență de ADN ce interacționează cu un factor de transcripție și o topoizomerază astfel încât, atunci când se leagă un anumit factor de transcripție, topoizomeraza să asigure asamblarea domeniului într-o configurație activă.

Punctul de bază pentru structura cromatinei poate fi reprezentat de **regiunea asociată matrixului (MAR)** sau **regiunea de atașare la scaffold (SAR),** adică la eșafodul nonhistonic al cromozomului, după cum au descris Cockerill și Garrard (1986) la gena catenei imunoglobulinice kappa de șoarece, și Laemmli și colaboratorii (1986), la mai multe gene de la *Drosophila*

Conceptul *domeniului cromatinic ca unitate de reglare a activității genice în cursul dezvoltării* are implicații importante. Una dintre ele este aceea că elementele de secvență aflate imediat în amonte de gene, alături de factorii transactivatori ce se leagă la ele, au fost obiectul multor studii de biologie moleculară, cu rezultate importante. S-a conchis că expresia genică este sensibilă la starea domeniilor cromatinei în care gena considerată se află localizată.

2.5. ORGANIZAREA MATERIALULUI GENETIC ÎN CROMOZOMII INTERFAZICI

În interfază, cromozomii ating un grad maxim de despiralizare și extensie. În această perioadă a ciclului celular, materialul cromozomal este organizat sub forma **cromatinei nucleare**, agregat nucleoproteinic stabil, cu afinități tinctoriale pentru coloranții bazici.

Cromatina se găsește în nucleu sub două forme: 1) cromatina densă — **heterocromatina**, sub forma de zone neregulate, osmiofile la microscopul electronic, zone care se colorează intens cu coloranți bazici; 2) cromatina laxă — **eucromatina**, ca o rețea de filamente extrem de fine.

Heterocromatina reprezintă regiunile puternic spiralizate din cromozomi, deci puțin active, iar eucromatina, segmente cromozomale puternic despiralizate și active. ADN eucromatic este alcătuit, în principal, din secvențe nucleotidice unice, dar și din secvențe repetitive care servesc ca stopuri transcripționale.

Heterocromatina este clasificată în două categorii: facultativă și constitutivă.

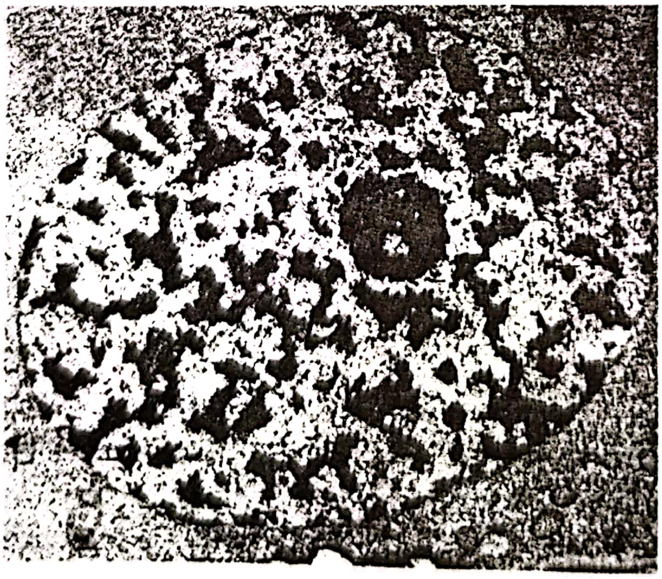


Fig. 11 — Imaginea electronomicroscopică a nucleului de *Allium cepa* în care porțiunile heterocromatice, condensate al cromozomilor interfazici reprezintă singurele ce pot fi vizualizate la microscopul electronic, restul cromozomilor constituind sectoarele despiralizate, active transcripțional. În centrul nucleului se află nucleolul, reprezentat în imagine de o mică parte a sa, secțiunea trecând sagital spre periferia nucleolului (original) x 36.000.

Heterocromatina facultativă reprezintă 2,5% din genom și se prezintă sub o formă condensată, încă de la începutul embriogenezei. Heterocromatina facultativă sau cromatina sexuală este reprezentată de unul din cromozomii X de la femelele de mamifere, cromozom care, aleator ca origine maternă sau paternă, în timpul embriogenezei, devine heterocromatic, dând corpusulul Barr.

Heterocromatina constitutivă reprezintă regiunile condensate ale cromozomilor și este prezentă sub această formă în toate stadiile, fiind cantonată în special la nivelul regiunilor pericentromerice, putând fi evidențiată cu ajutorul tehnicii de bandare C.

Proprietățile comune ale heterocromatinei facultative și constitutive sunt:

a) se replică târziu în faza S;

b) rămân în stare condensată în toate fazele ciclului celular;

c) sunt inerte genetic.

Histonele sunt proteinele care conferă ADN din nucleul interfazic cele două proprietăți care asigură replicarea ADN și transcrierea genetică. Cele două proprietăți sunt:

1. superhelicitatea negativă
2. poziționarea nucleosomilor

Superhelicitatea negativă este reprezentată de răsucirea ADN în jurul octamerilor histonici, într-o direcție care îl suprarăsucește negativ, adică într-o direcție care tinde să desfacă dublul helix. Această superhelicitate negativă permite dublului helix să fie mult mai ușor de desfăcut pentru expunerea catenelor matriță în vederea replicării sau în vederea transcripției unei gene, după îndepărtarea histonelor.

Poziționarea nucleosomilor, adică dispunerea acestora într-o anumită poziție care să permită expunerea promotorilor la acțiunea polimerazelor și a factorilor de transcripție sau, din contră, ascunderea lor, se realizează tot cu ajutorul histonelor. Eliberarea de histone într-o anumită zonă permite câștigarea unei poziții care asigură atașarea factorilor de transcripție la secvențele promotorilor (Lu și colab., 1993)

Arhitectura tridimensională a cromozomilor în nucleu este influențată de organizarea secvențelor de nucleotide. Regiunile heterocromatice, formate din șiruri lungi de secvențe repetitive, adesea se asociază, chiar și atunci când aparțin unor cromozomi diferiți.

Dispoziția intercalată a secvențelor de nucleotide este generată de evoluția divergentă a secvențelor, de rearanjamente și translocări, de amplificări și deleții, fenomene care sunt ușor tolerate de ADN non-informațional. Aceste fenomene sunt responsabile de arhitectura moleculară a genomului.

Genomul eucariot are o organizare dinamică. Cantitatea de ADN nuclear este foarte variabilă. În cursul dezvoltării au loc variații ale cantității ADN (evident, în zonele necodificatoare ale genomului), precum și ale morfologiei cromatinei, aceste modificări având un rol important în reglarea genică și diferențierea celulară.

O dovadă a adoptării unor morfologii particulare a cromatinei, cu implicații funcționale deosebite, este existența cromozomilor politeni și a cromozomilor lampbrush.

3. ORGANIZAREA SUPRACROMOZOMALĂ A GENOMULUI EUCARIOT

Cel care a enunțat clar ideea existenței unor organizări supracromozomale a genomului eucariot a fost DuPraw (1970), dar date referitoare la existența unei asemenea organizări sunt vechi. Ele au fost publicate încă din 1936, de către Cleland, care a arătat că cei 14 cromozomi de *Oenothera lamarkiana* apar interconectați prin telomere, spre a da o structură circulară. În 1960, Spurway și Callan descriu asociații de 3 sau 4 cromozomi la hibrizii dintre diferite specii de *Triturus*.

Ulterior, s-au acumulat numeroase date privitoare la asocierile intercromozomale la diferite specii sau culturi de celule, evidențiindu-se microchirurgical existența de fibrile intercromozomale.

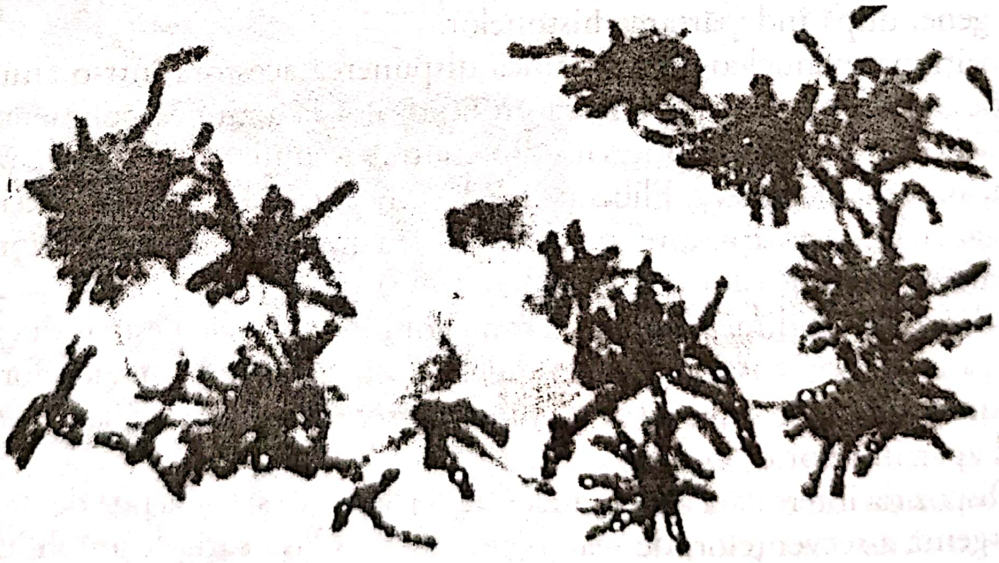


Fig. 12 — Organizare supracromozomală la *Allium cepa* (original).

La diferite specii de diptere, la nivelul cromozomilor politeni, precum și la *Alium cepa*, la nivelul cromozomilor metafazici, Gavrilă (1983, 1984) a dovedit clar organizarea supracromozomală, evidențiind fibrele intercromozomale (fig. 12, 13, 14, 15).

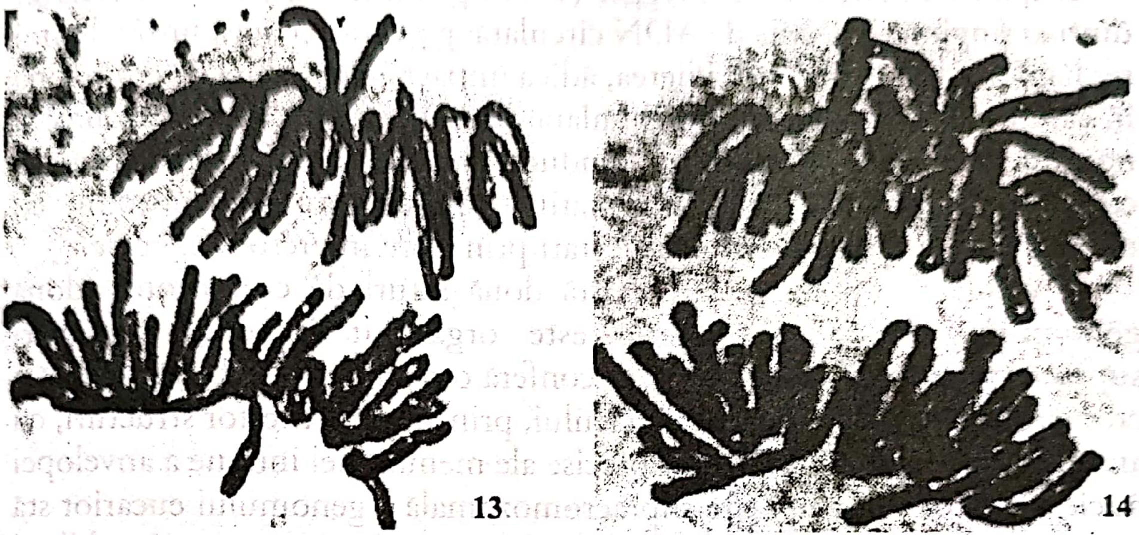

13
14

Fig. 13, 14 — Cromozomi „înaintați“ - organizatori genomici în anafază la *Allium cepa*; (original).

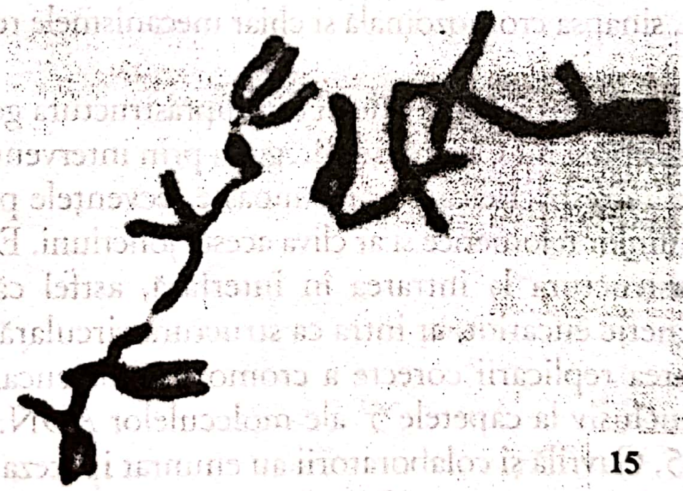

15

Fig. 15 — Organizare supracromozomală la *Allium cepa*; (original).

După Myhra și Bregger (1976) fibrele intercromozomale stabilesc o suprastructură care asigură distribuția exactă a cromozomilor în celulele aflate în diviziune.

Organizarea supracromozomală a genomului eucariot este susținută și de alte date precum reducerea somatică la plante, distribuție nerandomică a cromozomilor, sub forma lor decondensată, neindividualizată în nucleul interfazic, etc.

După B. Chiarelli și A. Bregger (1978) genomul eucariot este alcătuit dintr-o singură moleculă de ADN circulară, gigantică, corespunzând unui set haploid de cromozomi. Plierea, adică împachetarea fibrei de cromatină în care intră această moleculă circulară de ADN și proteinele histonice și nonhistonice corespunzătoare, conduce la apariția diferitelor stări ale cromatinei, incluzând heterocromatina condensată și cromozomii cu morfologia lor specifică, interconectați prin fibre intercromozomale.

În celula diploidă, în care există două seturi de cromozomi (două genomuri), materialul genetic este organizat în două structuri supracromozomale inelare, ceea ce conferă o distribuție stabilă și exactă a cromatinei interfazice în sfera nucleului, prin atașarea acestor structuri, cu anumite zone ale lor, la situsuri precise ale membranei interne a anvelopei nucleare. Această organizare supracromozomală a genomului eucariot stă la baza unei organizări rapide și precise a cromatinei în structuri stabile și constante care sunt cromozomii.

Organizarea supracromozomală explică, de asemenea, distribuția nerandomică a materialului genetic în nucleul interfazic, recombinarea genetică exactă, sinapsa cromozomală și chiar mecanismele rearanjamentelor cromozomale.

Separarea de cromozomi individuali din suprastructura genomică ar avea loc, potrivit concepției lui Chiarelli și Bregger, prin intervenția unor enzime endonucleazice de restricție care ar recunoaște secvențele palindromice de la nivelul joncțiunilor telomerice și ar cliva aceste joncțiuni. Enzimele ligazice ar reface suprastructura la intrarea în interfază, astfel că, în replicarea materialului genetic eucariot, ar intra ca structură circulară, explicându-se astfel posibilitatea replicării corecte a cromozomilor eucariotici pe toată lungimea lor, inclusiv la capetele 5’ ale moleculelor ADN.

În anul 1995, Gavrilă și colaboratorii au enunțat ipoteza existenței unui *cromozom organizator genomic* (GOC), cu rol în coordonarea aranjării cromozomilor în placa metafazică și a migrării anafazice, funcționând ca un fel de ghid în așezarea cromozomilor neomologi ai fiecărui set haploid de cromotomi în nucleul interfazic. În fiecare celulă diploidă există câte doi cromozomi organizatori genomici, câte unul pentru fiecare genom haploid. Ipoteza existenței GOC a pornit de la analiza a numeroase cazuri de așa numiți „cromozomi înaintați“ care apar în trecerea de la metafază la anafază, (fig. 13, 14) precum și de la constatarea ajungerii la poli, înaintea tuturor, a unuia, adesea a doi asemenea „cromozomi înaintați". Ipoteza s-a mai bazat și pe numeroasele argumente aduse de către Lima-de-Faria (1983), referitoare la COMUNICAREA CROMOZOMALĂ ȘI CÂMPUL CROMOZOMAL.

CAPITOLUL XXII

ORGANIZAREA GENOMICĂ LA EUGLENOPHYCEAE

1. INTRODUCERE

Euglenoficeele consitituie un grup de microorganisme fotosintetizatoare deosebit de interesante care se apropie mai mult de protozoarele superioare decât de alge, fiind adesea considerate „animale“ cu cloroplaste funcționale. Există chiar și specii saprofite, incolore, lipsite de cloroplaste care sunt foarte asemănătoare cu cele verzi, fotosintetizatoare. Astfel, **Astasia** și **Khawkinea**, forme saprofite, incolore, se aseamănă cu **Euglena**, după cum **Hyalophacus** se aseamănă cu **Phacus**, pe când **Trachelomonas** incoloră se aseamănă cu **Trachelomonas** pigmentată, fotosintetizatoare. Se admite că formele incolore au derivat, prin mutație, din cele pigmentate, în urma pierderii cloroplastelor.

Celula euglenoficeană are materialul genetic organizat în numeroși cromozomi, permanent condensați, dispuși într-un spațiu genetic delimitat de o anvelopă nucleară, permanentă, ceea ce înseamnă că este tipic eucariotă. Cromatina — substanța cromozomilor — este și ea tipic eucariotă, atât la nivel molecular (fibra nucleohistonică), cât și la nivel molecular, fiind alcătuită în principal din ADN și proteine histonice. La nivel ultrastructural, fibra de cromatină euglenoficeană se prezintă ca o structură fibroasă, cu fibrile axiale și cromomerice (Haapala și Soyer, 1975) și cu o organizare nucleosomală tipică. În interiorul nucleului euglenoficean se află un nucleol mare, care s-a numit **endosom** sau **cariozom** și care rămâne permanent, în tot cursul ciclului celular, fiind un element activ participant în procesul de diviziune a nucleului și separare a cromozomilor-fii în cei doi nuclei-fii, rezultați în urma unui proces de „gâtuire“, de constricție, a nucleului inițial.

2. DIVIZIUNEA EUGLENOIDĂ — HAPLOMITOZA

În anul 1894, Blochmann a realizat prima descriere a diviziunii nucleare la mai multe specii de **Euglena: E. deses**, **E. spirogyra**, **E. velata**, și **E. viridis**, investigațiile sale fiind confirmate, în anul următor, 1895, de către Keuten. În anul 1933, Dangeard a descris diviziunea nucleară euglenoficeană prin termenul de **haplomitoză**. Ulterior, Hollande (1952), Leedale (1958–1968), Saito (1961) și Gavrilă (1978, 1981) au descris în detaliu evenimentele succesive ale diviziunii euglenoide.

În anul 1916, Tschenzoff a remarcat prezența cariosomului, în interiorul nucleului de **Euglena** sp., denumit ulterior **endosom**. La **E. acus** există mai mulți asemenea endosomi, situație întâlnită și la **Heteronema** sp., la care Leedale (1966) a descris prezența unui endosom fragmentat. Componenta chimică principală a endosomului este ARN. O'Donell (1965) a identificat, la nivel ultrastructural, prezența în interiorul endosomului de fibrile digerabile cu DNază, de unde s-a dedus că sunt alcătuite din ADN. Ele reprezintă, în interpretările pe care le putem da actualmente, componente ale regiunii organizator nucleolare, la nivelul lor aflându-se cistroni ribozomali.

Speciile cu celulă alungită au un nucleu alungit, de lățime redusă sau formă ovoidală. Hollande (1952) a evidențiat la nivel microscopic prezența în structura nucleului a unor filamente de cromatină moniliforme care înconjoară endosomul și care se atașează în puncte specifice, la anvelopa nucleară, radiind spre endosom, fără a avea însă vreun contact cu aceasta.

Diviziunea nucleară euglenoidă este un tip particular de mitoză, cu anvelopă nucleară persistentă și fără intervenția vreunui aparat fusorial (fig. 1). Diviziunea se realizează într-un plan care este perpendicular pe axa longitudinală a celulei. Înainte de diviziune, are loc replicarea și bipartiția tuturor organitelor celulei (aparatul Golgi, stigma, plastidele, pirenoidul, mitocondriile etc.). Începând de la mijlocul diviziunii, endosomul, care la începutul diviziunii are o formă mai mult sau mai puțin oval-rotundă, începe să se alungească, luând mai întâi formă de cilindru, după care, prin scurgerea substanței sale dinspre mijloc spre capete, ia formă de halteră, pe când cromozomii dedublați îl înconjoară ca un manșon, la nivelul mijlocului subțiat, al acestui endosom.

Capetele umflate ale endosomului alungit reprezintă polii spre care cromatidele (cromozomii-fii) se deplasează printr-o mișcare de alunecare (repulsie) a acestora spre polii opuși (Leedale1958–1968; Gavrilă 1973, 1978, 1981). La speciile cu mai mulți endosomi, precum **E. acus**, aceștia fuzionează într-un endosom unic, pe când celula se pregătește să realizeze diviziunea nucleului. Ca și la dinoflagelate, la euglenoficee, în absența unui fus de diviziune, nu există o placă metafazică. Echivalentul unei metafaze tipice este reprezentat la euglenoficeele de stadiul în care cromozomii

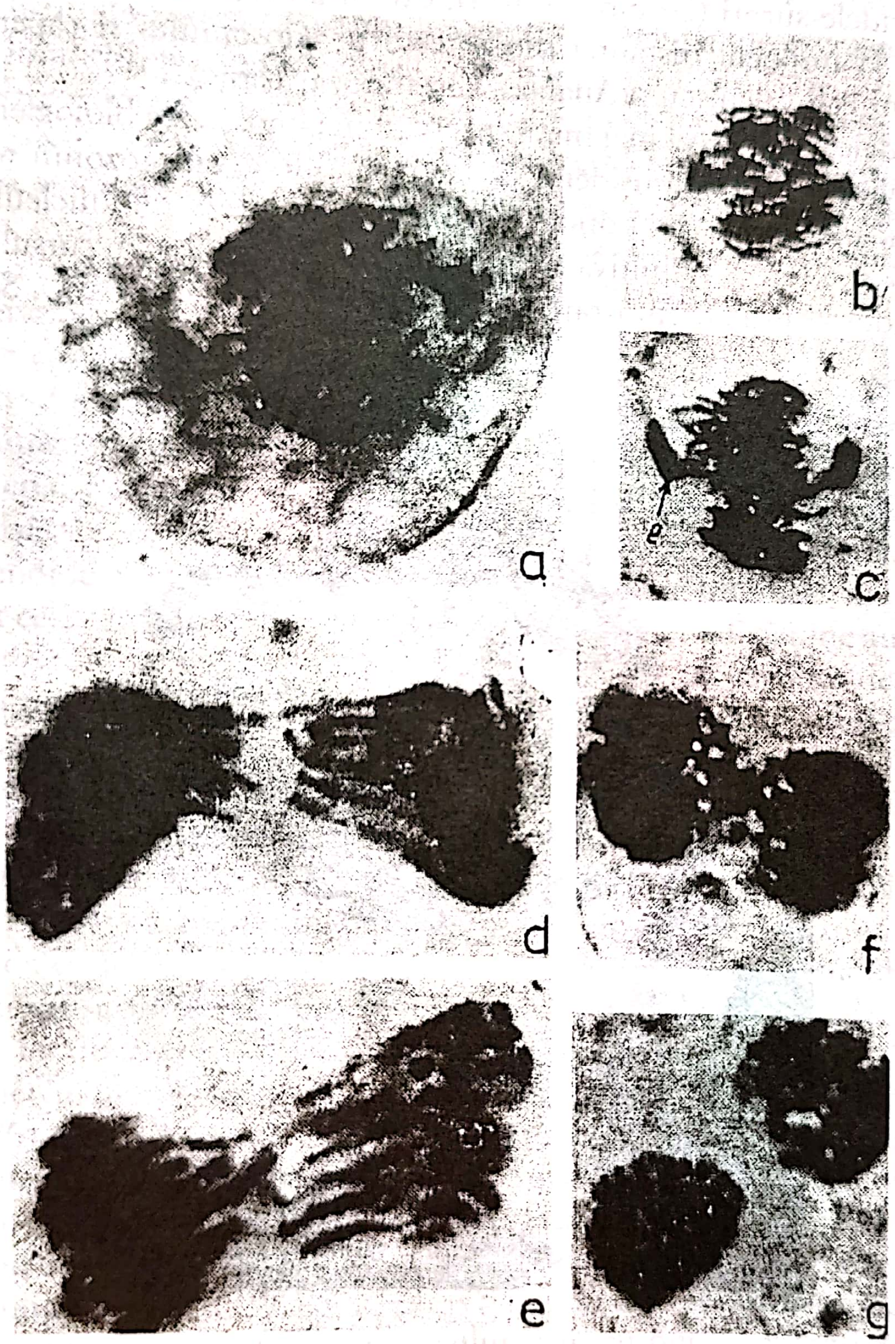


Fig. 1 — Etape succesive în evoluția nucleului în diviziunea euglenoidă
a–c – echivalentul Metafazei; d–e – Anafază; f – Telofază; g – Interfază. (original)

dedublați iau o dispoziție paralelă, înfășurând ca un manșon mijlocul endosomului alungit. Pe măsură ce capetele endosomului se măresc progresiv, regiunea sa mediană devine progresiv mai subțire, până ce, în final, acesta se separă în doi endosomi-fii, spre care alunecă, în direcții opuse, cromatidele-surori (cromozomii-fii), existând un moment în care acestea se află la mijlocul distanței dintre centrul edosomului și capetele sale, moment echivalent cu o Anafază, din mitoza „clasică".

Leedale (1967), cel mai mare specialist în cunoașterea biologiei celulare a euglenoficeelor, a considerat că la euglenoficee, cromozomii realizează mișcări autonome, în pofida faptului că în interiorul nucleului, el a identificat o formă primitivă, simplificată, de fus nuclear. În cursul migrării spre endosomii-fii, cromozomii-fii capătă formă de L-, J, -V și U. Se admite

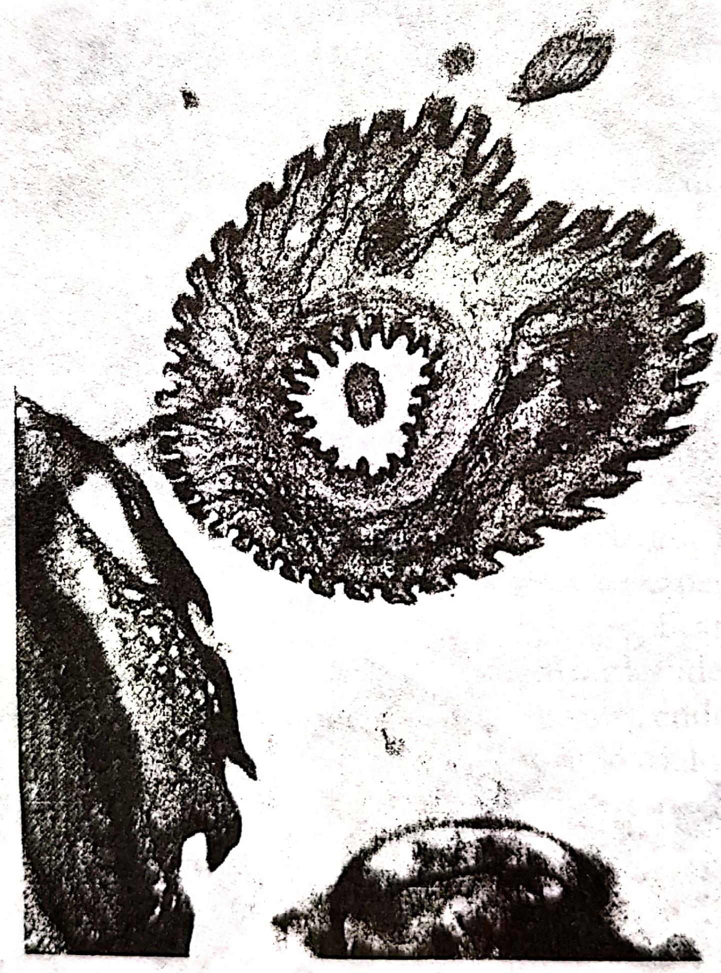


Fig. 2 — Imaginea electronmicroscopică a celulei de *Euglena terricola* aflată în interfază cu complexe peliculare egale (centru) și partea periferică a unei celule ce se pregătește pentru diviziune cu complexe peliculare în care cristele sunt inegale (original).

că există o mișcare de alunecare sau respingere a cromatidelor surori, desfășurată în paralel cu o scurgere rapidă, în direcții opuse, a substanței endozomului, dinspre mijloc, spre capetele opuse ale acestuia. Când această substanță a endosomului este pe deplin distribuită în cei doi endosomi-fii, aceștia se organizează ca structuri globulare, evidente, în centrul fiecărui nucleu-fiu. În același timp, în zona centrală, acolo unde apare golul dintre endozomii-fii, are loc un proces de gâtuire, de constricție a membranei nucleare care conduce la separarea a doi nuclei-fii. Deoarece separarea, segregarea și mișcările anafazice ale cromatidelor-surori nu sunt procese supuse sincronizării, Anafaza euglenoidă, spre deosebire de Anafaza mitozei tipice, durează foarte mult. Nu s-a putut da o explicație acceptată pentru mecanismul de respingere reciprocă a cromatidelor surori, din mitoza euglenoidă. Cromozomii-fii nu suferă vreo schimbare aparentă în starea lor de condensare, pe când are loc separarea celulelor-fiice, prin clivajul longitudinal al citoplasmei și intrarea în interfază. Acesta este tipul comun de mitoză euglenoidă, întâlnită la toate genurile de euglenoficee studiate: **Euglena**, **Peranema**, **Eutreptia**, **Lepocinclis**, **Astasia** și **Trachelomonas** (Leedale, 1966, 1967, 1968). La nivel ultrastrucutral, primul semn al mitozei euglenoide este apariția unor complexe peliculare fiice care sunt mai mici decât cele existente anterior. Celulele care nu suferă diviziune au crenelația acestor complexe peliculare cu creste egale (fig. 2). Înainte de a intra în diviziune, nucleul se mișcă spre corpii bazali (blefaroplaști), din care își trag originea flagelii. Acești corpi bazali se divid în două. Cromozomii se atașează la anvelopa nucleară, în punctul cel mai apropiat al acesteia de corpii bazali. Câte doi corpi polari migrează spre capetele opuse ale rezervorului flagelar și corpul bazal al fiecărei perechi elaborează un nou flagel. Leedale (1968) a considerat că această migrare a nucleului înainte de diviziunea sa este o dovadă că acești corpi bazali acționează ca niște centrioli, stabilind axa de diviziune și controlând procesul în sine al diviziunii euglenoide. În nucleul aflat în diviziune, în cursul Profazei, apar microtubuli de 250–300Å diametru, uneori aceștia fiind identificați și în nucleul interfazic. DuPraw (1970) a considerat că aparatul microtubular intranuclear de la **Euglena** facilitează alungirea nucleului în procesul diviziunii sale. Microtubulii sunt intim asociați cu endosomul, în Interfază și atunci când microtubulii se întind de la un capăt la celălalt al nucleului, endosomul metafazic-anafazic se alungește gradat. Nu s-au descris cazuri în care un microtubul se întinde de la un capăt la celălalt al nucleului, sau, cu puține excepții, în care un microtubul să fie atașat la un anumit cromozom (fig. 3, 4). Se admite că la euglenoficee există un aparat fusorial intranuclear, cu microtubuli

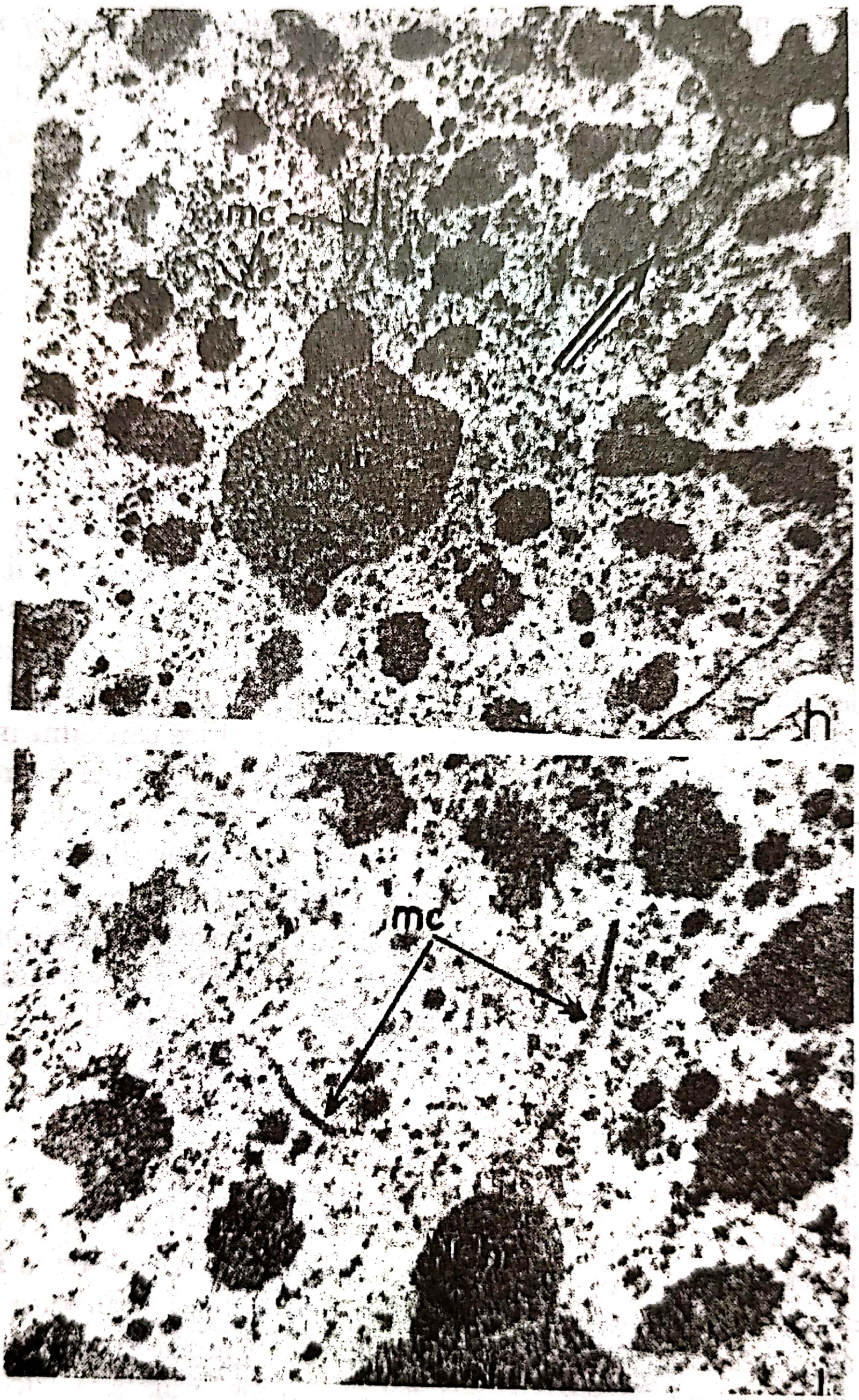


Fig. 3 — Structura fină a nucleilor și cromozomilor de *Euglena terricola*. Nucleolul (Nu) constituit în regiunea organizator nucleolară a unui cromozom organizator nucleolar (N Chr.) Săgeata indică prezența în interiorul nucleului a unor microcabluri (mc). Săgeata dublă indică un canal citoplasmatic ce pătrunde prin nucleu (original).

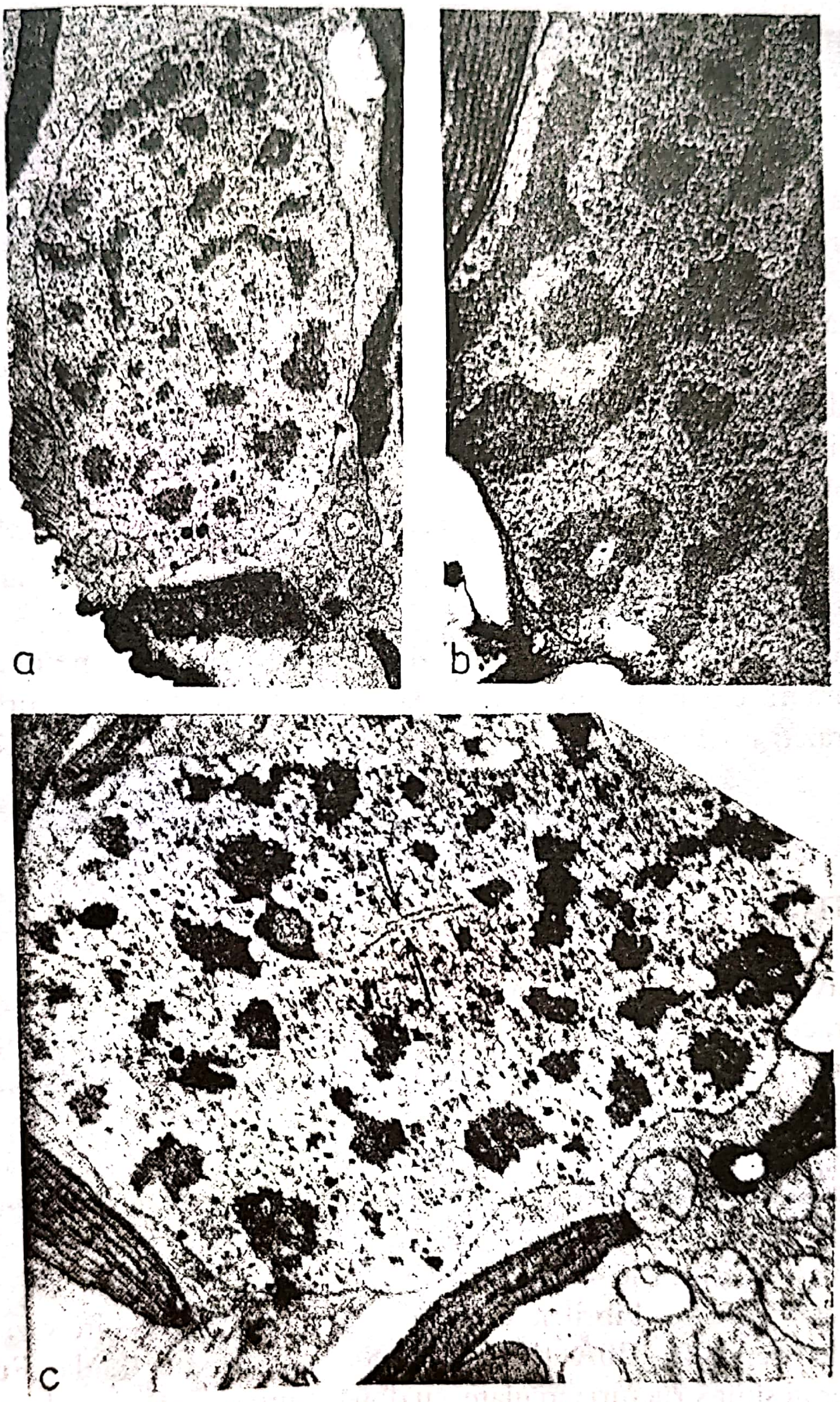


Fig. 4 — Structura fină a nucleilor (a) și cromozomilor (b și c) de *Euglena terricola*. A se nota forma de „V“ și de „U“ a cromozomilor în clivaj în (a) și atașarea cromozomilor la membrana internă a anvelopei nucleare (b). În figura (c) o structură sub forma unui filament dublu (săgețile) pare a fi în legătură cu un cromozom care clivează.
a x 25.000; b x 60.000; c x 45.000 (original).

nucleoplasmici, așa cum a fost descris de către DuPraw (1970). Cercetările noastre (Gavrilă, 1996) au evidențiat faptul că, în separarea cromatidelor-surori/ cromozomilor-fii, un rol major poate fi jucat de microcablurile — structuri filiforme intranucleare care aparent nu se află în legătură directă cu cromozomii care migrează.Lungimea ciclului celular al **E. gracilis** este următoarea: Profază, 12 minute; pentru echivalentul Metafazei, 25 minute; 71 minute, pentru Anafază și 15 minute, pentru Telofază. La **E. spirogyra,** durata acestor faze este de 15, 20, 44, 21 de minute, pe când clivarea celulei are loc în 69 de minute (Leedale, 1968). Viteza de deplasare anafazică a cromozomilor este de 0,1 — 0,12µm/min. La unii reprezentanți ai grupului a fost descrisă și amitoza, prin fragmentarea nucleară, care poate conduce la o distribuire inegală a substanței nucleare, dar care nu afectează viabilitatea celulară sau alte trăsături strucural-funcționale, probabil datorită gradului înalt de redundanță genetică (poliploidie).

O dificultate în realizarea unei descrieri clare a evenimentelor ce se desfășoară în celula euglenoficeană este generată și de prezența numeroșilor endoparaziți intranucleari, descriși de numeroși autori (Gavrilă și colab., 1981).

3. STRUCTURA FINĂ A CROMATINEI EUGLENOFICEELOR

La nivel ultrastructural, nucleoplasma euglenoficeelor are un aspect granular, cu un matrix mai puțin dens (fig. 3, 4), pe când cromozomii apar ca structuri fibroase dense (fig. 3, 4), mai dense la **Trachelomonas** decât la **Euglena** (fig. 5).

Investigațiile lui Haapala și Soyer (1975) asupra cromozomilor de **Euglena gracilis**, dispersați pe suprafața apei și studiați la microscopul electronic, au evidențiat prezența fibrilelor axiale sau a unor fibrile ale axei cromomerice și fibrile cromomerice, având aceeași organizare, ca la eucariotele evoluate. Fibrilele cromomerice par a fi alcătuite din unități sferoidale de 100–120Å diametru. S-a considerat că la **Euglena**, cromozomii sunt structuri circulare, cu două segmente continui de structură uninemică; axa continuă a cromozomului și fibrilele cromomerice. Aspectul moniliform al fibrilelor este rezultatul spațierii dintre subunitățile adiacente. Condensarea permanentă a cromozomilor la euglenoficee se bazează pe atașarea permanentă a fibrilelor cromomerice de-a lungul axei, ceea ce face ca cele mai multe gene să fie inactivate, ca urmare a inducerii

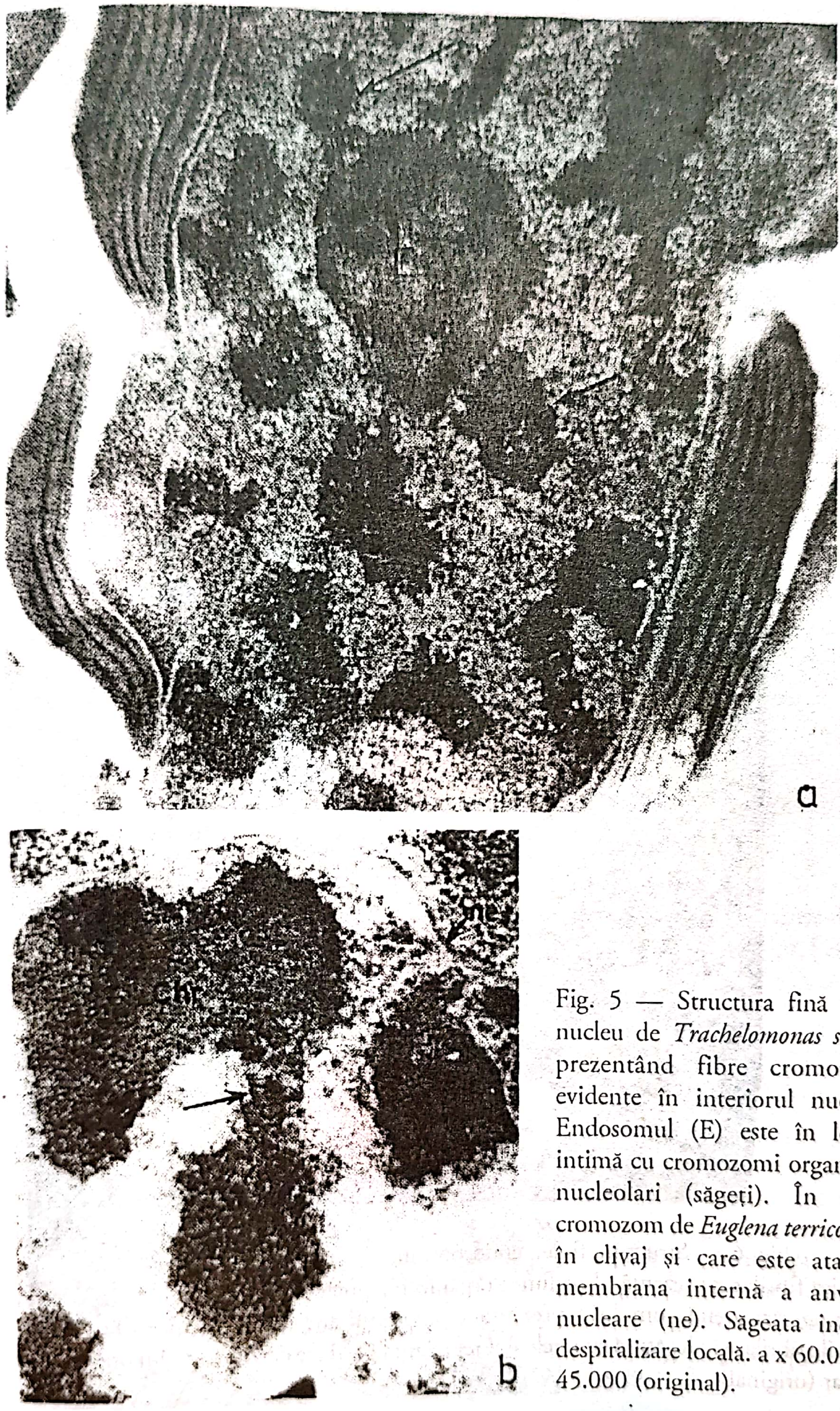


Fig. 5 — Structura fină a unui nucleu de *Trachelomonas superba*: prezentând fibre cromozomale evidente în interiorul nucleului. Endosomul (E) este în legătură intimă cu cromozomi organizator-nucleolari (săgeți). În b, un cromozom de *Euglena terricola* aflat în clivaj și care este atașat de membrana internă a anvelopei nucleare (ne). Săgeata indică o despiralizare locală. a x 60.000; b x 45.000 (original).

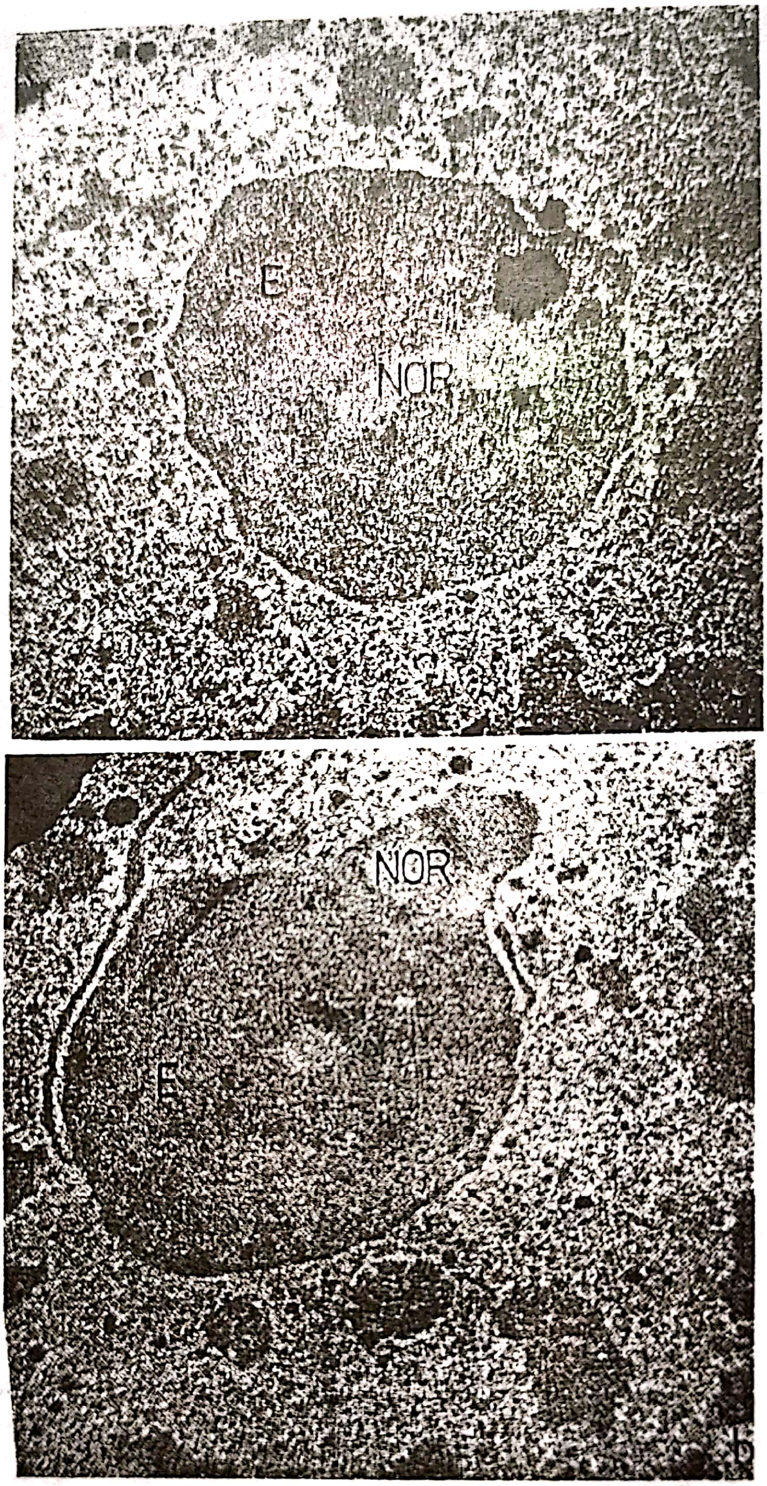


Fig. 6 — Structura fină a endosomului (e) de *Euglena terricola*
a. un miez fibrilar reprezentând regiunea organizator nucleolară (NOR);
b. o înmugurire a endosomului reprezentând rezultatul amplificării genice ribozomale. Structurile fibrilare în legătură cu nucleolul reprezintă părți ale cromozomului organizator nucleolar (original).

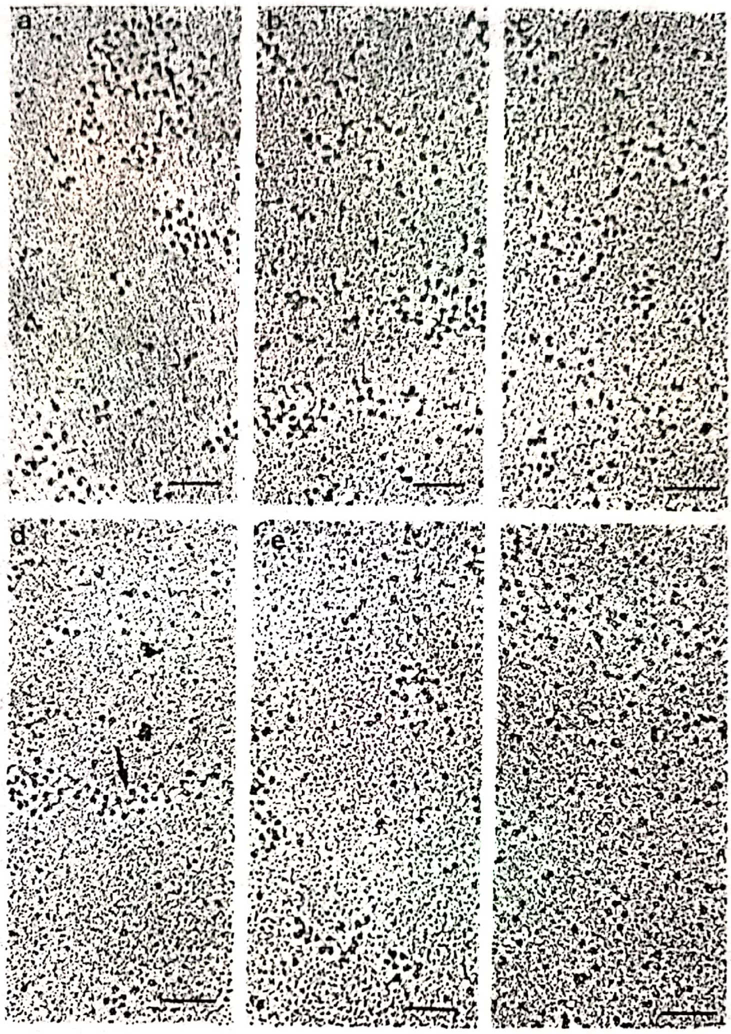


Fig. 7 — Structura nucleosomală a cromatinei la *Euglena gracilis*, la cultura de control (a, b, c) și la cultura sărăcită în vitamina B12 (d, e, f) (fotografie oferită de Dr. Lefort-Tran, de la laboratorul de Biochimie, Gif-sur-Yvette, Franța).

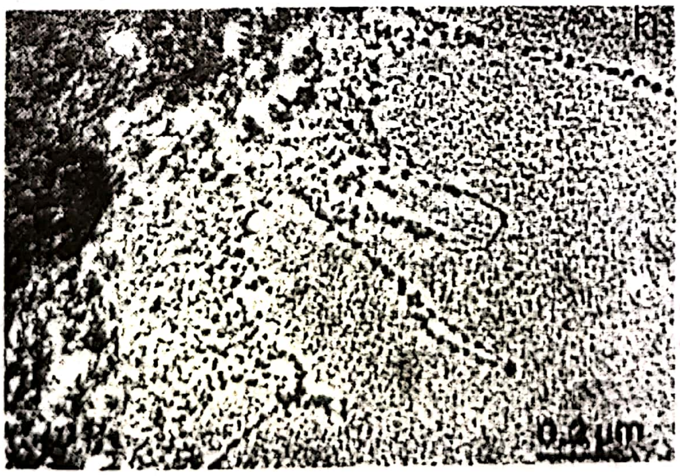


Fig. 8 — Structura cromatinei împrăștiate din nucleul de Euglena cu organizare nucleosomală evidentă (după Delpech și colab., 1982)

acestei stări de condensare permanentă. Dar, la orice nivel cromozomal, activitatea genică într-o anumită regiune cromomerică ar fi facilitată de un mecanism local de decondensare, asemănător aceluia întâlnit la nivelul regiunii organizator nucleolare, din cromozomul dinoflagelatelor. Asemenea despiralizări ale cromatinei la nivelul regiunilor organizator nucleolare permit sinteza precursorilor ribozomali ARNr care, depozitându-se pe matrița ADN de pe care sunt transcriși, conduc la codificarea unor nucleoli (endosomi) foarte mari, așa cum au fost întâlniți la **Euglena terricola** (fig. 6).

Bertaux și colaboratorii (1978) au descris componentele granulare și fibrilare, precum și procesul de „vacuolizare“ a endosomilor, la **E. gracilis**, demonstrându-se prezența de structuri care conțin ADN, aceste structuri constând dintr-un inel dublu și fiind similare cu structurile caracteristice nucleolilor altor euglenoficee. S-au estimat între 2 și 6 asemenea inele ADN, per secțiune de nucleol, în celulele normale, pe câtă vreme, în cele supuse deficienței în vitamina B12 apar până la 15 asemenea structuri. Asemenea structuri intranucleolare au fost descrise ca regiuni de densitate electron-optică joasă (Leedale, 1968), sau ca *„vacuole“*, *„cockade“* sau *„formații annulare“* (Calvayrac și colab, 1972).

Cercetările noastre, de microscopie electronică, ne-au permis să evidențiem asociații clare nucleol-cromatină, unii cromozomi fiind clar organizatori nucleolari (vezi fig. 5). La nivel ultrastructural, cromozomii de **Euglena** apar ca structuri masive, fibroase, unii atașați vizibil la membrana nucleară sau în contact cu endosomul. Fibre intercromozomale au putut fi evidențiate, atât la **E. terricola** cât și la **Trachelomonas superba** (vezi fig. 5). Unul dintre cele mai interesante aspecte ale structurii fine a nucleului de **E. terricola** este prezența anumitor structuri intranucleare, filamentoase, aparent fără nici o legătură cu cromozomii, ce se aseamănă cu microcablurile intranucleare, descrise de Soyer (1981), la dinoflagelatul **Prorocentrum micans.**

Activitatea cromatinei euglenoficeelor în transcripția genică este condiționată de despiralizarea locală a structurii cromozomului permanent condensat, așa cum a fost evidențiată electronomicroscopic la **E. terrricola** (vezi fig. 5). Delpech și colaboratorii (1982) au evidențiat organizarea nucleosomală a fibrei de cromatină euglenoide. Diametrul miezului particulei nucleosomale corespunde la o lungime de 145 perechi de nucleotide de ADN, aspectul moniliform al cromatinei nucleilor euglenoficeeni (fig. 7, 8), tratați prin tehnica împrăștierii, introdusă de către O. Miller, este acela caracteristic organizării nucleosomale de la alte eucariote.

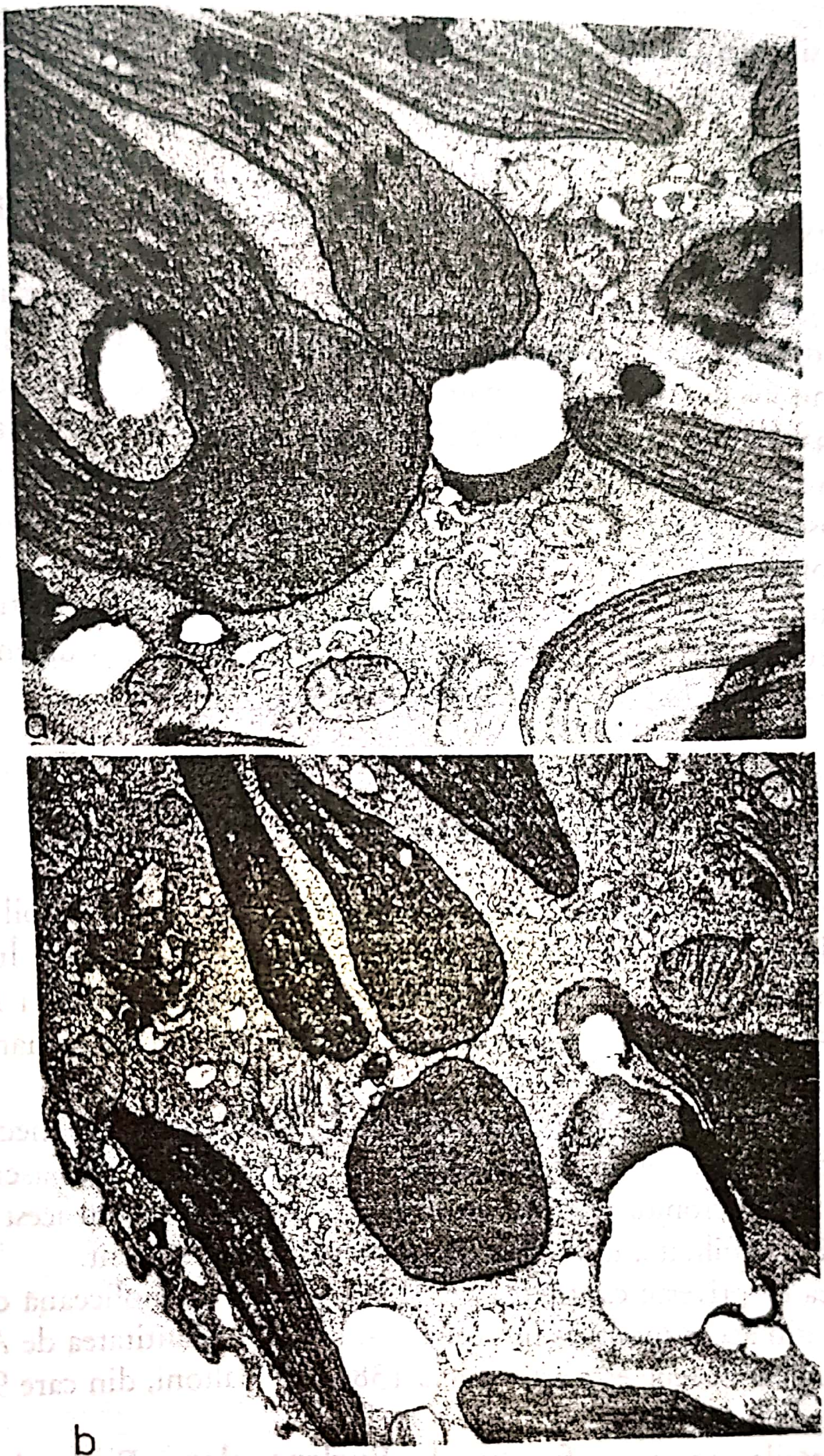


Fig. 9 — Proces de parasexualitate la cloroplastele de *Euglena terricola*: sus – două cloroplaste care au fuzionat, formând un cloroplast-zigot ce prezintă modificări majore în structura tilacoidelor; jos – diviziunea în două a cloroplastului-zigot, la nivelul celor doi produși ai diviziunii urmând a avea loc reorganizarea sistemului tilacoidal. (original)

Haapala și Soyer (1975) și Bré și colaboratorii (1979) au adus astfel dovezi certe, privind organizara nucleosomală a cromatinei euglenoficeelor.

4. CLOROPLASTELE EUGLENOFICEELOR ȘI PARASEXUALITATEA

La Euglenophyta au fost descrise și aspecte ale procesului sexual și ale meiozei, doar la specia **Hyalophacus ocellatus** (Leedale, 1962), dar aceste procese nu au mai fost confirmate și la alte specii de euglenoficee, deși procese parasexuale de fuziune de cloroplaste la **Euglena terricola** au fost evidențiate indubitabil, de către Gavrilă și colaboratorii (1987), prin cercetări de microscopie electronică (fig. 9). De asemenea, asociații cromozomale de tip bivalenți au fost identificate ocazional, de către Gavrilă și colaboratorii (1981), la **E. terricola**, dar ele nu au mai fost identificate șI la alte specii, astfel că procesul sexual asociat unei meioze, la Euglenophyta, spre deosebire de Dinoflagellatae, este încă discutabil.

5. VARIAȚIA NUMĂRULUI DE CROMOZOMI

În ceea ce privește numărul de cromozomi acesta este variabil între 4 (**E. gracilis**) și 190 (**E. velata**), respectiv 226 (**Phacus longicauda**). În cadrul complementului cromozomal de la **Colacium mucronatum** și **Phacus pyrum** s-au descris și unii cromozomi cu dimensiuni mult mai mari, decât ale celorlalți cromozomi.

Leedale (1968) implică poliploidia și aneupoidia ca mecanisme principale ale evoluției genomului la euglenoficee. De asemenea, rearanjamentele cromozomale au putut juca un rol important în acest proces, generând variabilitate, în absența unui proces sexual eficient.

În ceea ce privește cantitatea de ADN, celula euglenoficeană conține jumătate din aceea întâlnită în celula mamiferelor. Cantitatea de ADN a celulei euglenoficeene este estimată la 138 x 10^9 daltoni, din care 97% se află în nucleu.

Cercetările noastre, efectuate la **Euglena clara**, **E. terricola** și **Peridinium tabulatum**, prin citofotometrie, au arătat că la euglenoficee se află o cantitate de ADN pe jumătate din aceea a dinoflagelatului (Gavrilă și colab, 1981). În ADN de **Euglena gracilis** a fost identificată și 2,3% acid 5–metilcitidilic.

Analiza denaturării-renaturării ADN de **E. gracilis** a permis identificarea a trei clase distincte de ADN: una înalt repetitivă, alta mijlociu repetitivă şi o fracţie nerepetitivă (Rawson, 1975). Densitatea medie a ADN nuclear de **Euglena gracilis** este de 1,705 — 1,708 g/cm^3, ceea ce corespunde la un conţinut G+C, de 46–49 mol% (Brawerman, 1968; Edelman şi colab., 1965). ADN cloroplastic de **E. gracilis** are o densitate de 1,685 g/cm^3, reprezentând 3% din ADN celular total.

ADN mitocondrial de **E. gracilis** are o densitate de 1,690 — 1,692 g/cm^3 şi un conţinut G+C de 25%.

Zone fibrilare în mitocondriile de **Euglena** sp. reprezentând prezumtivul ADN mitocondrial precum şi structuri paracristaline, în cloroplastul acestei euglenoficee, au putut fi eviden]iate electronomicroscopic (fig. 10 şi 11).

CAPITOLUL XXIII

GENOMUL DROJDIILOR

1. INTRODUCERE

Saccharomyces cerevisiae reprezintă un excelent model pentru studiul altor organisme eucariote. Acest lucru se datorează numărului relativ mic de gene din genom și similitudinii existente intre genele de drojdie și cele ale eucariotelor superioare. Prin urmare, analizele genomice comparative pot servi la identificarea genelor de drojdie cu secvență înrudită cu cea a genelor din alte organisme sau, alternativ, gene heterologe și căi potențial complete pot fi introduse în celulele de *S.cerevisiae* pentru studii de analiză funcțională.

Utilitatea celulelor de *S.cerevisiae,* ca sistem model pentru înțelegerea funcționării genelor la eucariotele superioare este exemplificată prin două studii ce compară secvența genelor din genomul de *S.cerevisiae* cu cea a genelor celorlalte organisme. Astfel, compararea tuturor secvențelor proteinice de la drojdie cu cele de la mamifere a relevat faptul că aproximativ 31% din genele de drojdie au un omolog în genomul mamiferelor. Alte studii au vizat genele ce sunt asociate cu maladiile umane. Dintr-un total de 250 asemenea gene, 42% au un omolog în genomul de *S.cerevisiae,* omolog ce codifică proteine implicate în căile metabolice majore. Genele umane fără omologi în genomul de la *S.cerevisiae* codifică receptori, componente ale sângelui sau sistemului imunitar sau par să nu prezinte nici o similitudine cu vreo genă de la drojdie cu funcție cunoscută.

Interpretarea acestor analize trebuie făcută cu unele precauții, deoarece nu întotdeauna omologia de secvență se poate extinde la nivelul conservării funcționale. De exemplu, proteina CFTR (reglator al conductanței transmembranare în fibroza cistică - *cystic fibrosis transmembrane conductance* *regulator*) este un membru al familiei de transportori membranari ABC și transportă ioni de Cl^-. La drojdie, strâns înrudită cu gena pentru această proteină este gena YCF1 care, de asemenea, codifică un transportor ABC.

De asemenea, *S.cerevisiae* poate fi utilizat ca sistem tip de studiu al evoluției genomice la celelalte eucariote, fenomene precum schimbări ale ordinii genelor, duplicații genomice, transferul orizontal de gene și gene taxon-specifice fiind întâlnite și la vertebrate.

S.cerevisiae posedă un sistem genetic molecular extrem de dezvoltat, motiv pentru care aceasta este considerată ca reprezentând un sistem experimental unanim acceptat ce a permis investigarea a numeroase procese biologice fundamentale (transcrierea și traducerea informației genetice, ciclul celular, transportul membranar etc.), precum și identificarea componentelor moleculare implicate în căile biologice esențiale. În plus, numeroasele gene izolate pană în prezent din *S.cerevisiae* sunt folosite la dezvoltarea de sisteme transformante, utile pentru creșterea numărului drojdiilor de importanță industrială.

O dată cu secvențierea completă a genomului de *S.cerevisiae* și cu punerea la punct a tehnologiilor capabile să caracterizeze transcriptomul și proteomul de drojdie, cercetările actuale se axează cu precădere pe studiul fiecărei gene din genomul de drojdie, etapă premergătoare stabilirii setului minim de gene necesar funcționării unei celule eucariote. În plus, obținerea unei colecții complete de tulpini mutante ar permite realizarea studiilor de analiză funcțională a genelor. În acest moment, se poate admite extinderea caracterizării fenotipice a unei tulpini mutante, prin includerea efectelor sale asupra transcriptomului și proteomului. Metodele cantitative și sensibile folosite la detectarea fenotipurilor vor fi esențiale pentru stabilirea funcțiilor genelor nou identificate în genom, în special cele care sunt membre ale familiilor de gene redundante. Aceste studii vor permite identificarea rețelelor reglatorii și, prin aceasta, încadrarea genelor în grupe funcționale.

2. GENOMUL NUCLEAR DE *S.CEREVISIAE*

Genomul nuclear de *S.cerevisiae* are o dimensiune de $1.35 x 10^4$ kpb și o lungime totală de 4.60mm, informația genetică conținută de acesta codificând un număr de $1.125 x 10^4$ proteine. Genomul haploid este alcătuit din 16 cromozomi (I - XVI), cu dimensiuni variind între 230kpb (cromozomul I) și 2078kpb (cromozomul XII).

Secvențierea completă a genomului de *S.cerevisiae* s-a realizat în anul 1996. Analiza secvenței întregului genom confirmă mare parte din studiile anterioare, dar relevă și multe surprize, schimbând o serie de puncte de vedere cu privire la conținutul genomului. Astfel, genomul de *S.cerevisiae* este bogat în informație genetică, din care, peste 70% este destinată secvențelor codificatoare (gene). În total, în genom, s-au identificat ~6300 gene potențial codificatoare de proteine, 120 gene ARNr, dispuse în tandem în cromozomul XII, 40 gene ce codifică ARN nuclear mic (snRNA- *small nuclear RNA*) dispersate în cei 16 cromozomi, și 273 gene pentru ARNt (aparținând la 43 de familii de gene), larg distribuite.

Genomul de *S.cerevisiae* conține 6368 cadre libere de citire (ORF - *Open Reading Frame*), dintre care, 4344 au fost identificate prin analize genetice și biochimice, iar 178 corespund la proteine mici ce conțin mai puțin de 100 aminoacizi. La acestea, se adaugă 1200 ORF-uri necodificatoare, care corespund la ORF-uri antisens, suprapuse, ce s-au replicat independent de partenerul lor sens, în cursul evoluției.

Mărimea unui ORF este de 1.450pb, cu o distanță intergenică de 472pb. Intronii sunt rari, iar cei existenți au dimensiuni mici (cel mult 1kb) și sunt localizați la capetele 5' ale genelor.

Una dintre surprizele oferite de secvențierea genomică a fost numărul genelor a căror existență nu a fost detectată anterior. Până în momentul secvențierii, doar 30% din secvențele codificatoare estimate au fost descoperite, prin studii convenționale, care le-au alocat unele funcții biologice. Pentru restul de 70%, unele informații funcționale au fost deduse din omologia cu alte gene, cu funcție cunoscută. Totuși, s-a dovedit că există și gene care nu prezintă omologie cu nici o altă secvență genomică și nici cu vreun ORF ipotetic.

O altă caracteristică importantă este nivelul ridicat al redundanței secvenței ce conferă o posibilă redundanță funcțională în genomul levurian. Analiza similitudinii de secvență indică faptul că aproximativ 25% dintre gene există sub formă de perechi de gene omologe. Dintre acestea, 376 perechi de gene sunt rezidente în regiuni ale genomului, desemnate ca regiuni de omologie a clusterului (CHRs- *Cluster Homology Regions*). CHR-urile sunt definite ca fiind regiuni ce conțin cel puțin trei gene omologe, prezente în aceeași ordine, având aceeași orientare relativă și care nu conțin mai mult de 50kp fiecare. Lungimea CHR-urilor variază între 7.5 – 170kp și ocupă aproximativ 50% din genom. Acestea sunt plasate atât la capetele, cât și în interiorul brațelor cromozomale. Aceste blocuri de omologie de secvență pot fi recunoscute atât la nivelul secvenței de nucleotide, cât și la nivelul omologiei secvenței de aminoacizi a produșilor proteinici. Multe CHR-uri au câștigat sau pierdut componente (gene, introni, elemente transpozabile și pseudogene) astfel încât, în interiorul CHR-urilor, doar 25% din gene sunt duplicate.

O serie de ipoteze sugerează faptul că aceste CHR-uri au luat naștere simultan printr-o duplicare desfașurată la scara întregului genom cu aproximativ 100 milioane de ani în urmă. Cu toate acestea, există un număr considerabil de perechi de gene omologe, localizate în afara CHR-urilor, cât și un numar relativ mic de familii de gene. Unele dintre acestea au luat naștere, probabil, în cursul duplicării ancestrale, în vreme ce originea celorlate este mult mai recentă.

3. CARACTERIZAREA TRANSCRIPTOMULUI DE LA *S.CEREVISIAE*

Elucidarea funcțiilor genelor neidentificate prin secvențiere sistematică genomică se bazează pe determinarea condițiilor fiziologice sau a stadiilor de dezvoltare în care aceste gene sunt exprimate și corelarea *pattern*-urilor lor de expresie cu cele ale genelor cu funcții bine cunoscute. Disponibilitatea secvențelor genomului complet oferă posibilitatea studiului eficient, la scara întregului genom, a expresiei genice la nivel ARN. De exemplu, la drojdii, orice ORF este identificat printr-o secvență de doar 12 nucleotide, fapt care face din drojdii un subiect ideal pentru studiul expresiei genice cu ajutorul tehnologiei SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*).

Termenul de **transcriptom** descrie setul complet de molecule ARNm prezente într-o celulă dată, nivelele de exprimare ale genelor codificatoare in anumite conditii date. Caracterizarea transcriptomului de drojdie este esențială pentru ințelegerea căilor și rețelelor reglatorii din celula de *S.cerevisiae*. Mai mult, analizele de expresie genică au detectat moleculele de ARNm pentru 87% dintre gene, molecule ce corespund ORF-urilor ipotetice identificate prin secvențiere genomică, confirmând astfel faptul că acestea reprezintă, într-adevăr, gene autentice.

Pornind de la faptul că funcțiile a 40-50% dintre gene sunt deja cunoscute, recent s-a imaginat o strategie analitică denumita FANCY (analiza functionala prin corăspunsuri în drojdie - *Functional Analysis by Co-responses in Yeast*). Conform acestei noi strategii, unele enzime pot fi grupate în așa-numitele "unități monofuncționale". Analiza produșilor de transcriere va permite gruparea genelor în unități funcționale care conțin membri cu funcție bine definită.

4. CARACTERIZAREA PROTEOMULUI DE DROJDIE

Corelația la nivel proteinic a noțiunii de transcriptom este **proteomul** - setul complet de proteine dintr-o celulă, țesut sau specie dată, existent în anumite condiții și identificat prin electroforeză bi-dimensională. Caracterizarea proteomului completează informațiile obținute prin analize bazate pe ARNm. Ca și transcriptomul, proteomul se caracterizează prin dinamică și permanentă schimbare, ca răspuns la diverși stimuli.

Compararea seturilor complete de proteine de la nematodul *Caenorabditis elegans* și *S.cerevisiae* au arătat că, în general, proteinele implicate în procesele biologice cheie sunt conservate în secvența și funcție, în vreme ce proteine ce diferă substanțial între cele două specii sunt asociate cu funcții sau căi organism-specifice. Prin urmare, în ultimă instanță, diferențele biologice dintre specii se explică în termenii diferențelor dintre genomurile lor.

5. EVOLUȚIA GENOMULUI DE LA *S.CEREVISIAE*

O dată cu secvențierea genomului de *S.cerevisiae* și pe baza datelor recente de analiză a expresiei și funcției genice s-a revăzut maniera de abordare a organizării și evoluției genomului eucariot. Analiza perechilor de gene duplicate apărute printr-o duplicare a întregului genom indică faptul că selectarea în vederea creșterii nivelului de exprimare a expresiei genice a reprezentat un factor important ce a determinat care gene să fie reținute sub formă duplicată și care gene să revină la statutul de “copie-unică”, adițional procesului de selecție de noi funcții genice.

Cercetări recente au evidențiat o serie de noutăți ce vizează evoluția moleculară a genomului de *S.cerevisiae,* cu referire directă la fenomenul de duplicație genomică și la evoluția ordinii genelor de-a lungul cromozomilor. Astfel, cea mai importantă descoperire legată de organizarea genomică la *S.cerevisiae* sugerează o posibilă duplicație a întregului genom. Ulterior, regiuni ale cromozomilor duplicați au suferit un proces de translocație la nivelul diferiților cromozomi, proces urmat de pierderea majorității genelor (~92%) din una sau ambele copii duplicate, conducând la apariția celor 55 de blocuri diferite de gene duplicate, existente în genomul actual. Această ipoteză este susținută de observația conform căreia genele duplicate sunt aranjate aproape întotdeauna în aceeași ordine, au aceeași orientare, iar ordinea lor este similară cu cea existentă înainte de duplicarea genomului.

Duplicarea parțială sau totală a genomului se pare că a avut un impact profund asupra evoluției multor organisme. Pe langă alterarea cariotipului și creșterea numărului genelor, duplicația determină reorganizarea ordinii locale a genelor și creșterea probabilității fixării rearanjamentelor genetice la scară cromozomală.

Descoperirea de regiuni largi duplicate de-a lungul cromozomilor de *S.cerevisiae,* ca și informațiile cu privire la ordinea genelor la speciile înrudite, sugerează faptul că *S.cerevisiae* este un tetraploid degenerat care a suferit o duplicație genomica în urmă cu aprox. 150 milioane de ani.

În ciuda frecvenței hibrizilor naturali de drojdie, se pare că poliploidia a fost extrem de rară în istoria evolutivă a genomului de *S.cerevisiae.* Analizele genomice sugerează că tetraploidia are loc o dată la 10^8 ani. Acest lucru indică o probabilitate extrem de scăzută de supraviețuire a unor specii alotetraploide precum *Sacharomyces pastorianus* – hibrid între *S. cerevisiae* și *S. bayanus.*

Din punct de vedere filogenetic, genul *Saccharomyces* este strans înrudit cu genuri precum *Kluyveromyces, Zygosaccharomyces* și *Torulaspora*, dar relațiile lor filogenetice sunt slab relevate de analizele de secvența a ARNr. Arborii filogenetici construiți pe baza secvențelor de proteine arată că *Candida albicans* și *Klyveromyces lactis* s-au separat de *S.cerevisiae* înainte de duplicarea genomului acesteia, în vreme ce speciile de *Saccharomyces sensu stricto* (*S.bayanus, S. pastorianus, S. paradoxus* și *S. cerevisiae*) s-au separat ulterior, motiv pentru care posedă gene duplicate. În ceea ce privește specia *Candida glabrata*, datele sugerează desprinderea sa de *S.cerevisiae* după duplicarea genomului, dar înainte de terminarea procesului de pierdere diferențială de gene, motiv pentru care relațiile dintre ordinea genelor (și numărul de copii al acestora) în cele două specii sunt complexe. Analize recente ale secvenței genomului de *C.albicans* indică faptul că frecvența crescută a inversiilor la scară restrânsă în care sunt implicate gene unice sau un număr mic de gene contigue este considerabil afectată atunci când se compară ordinea genelor între specii strâns înrudite (Fig. 1).

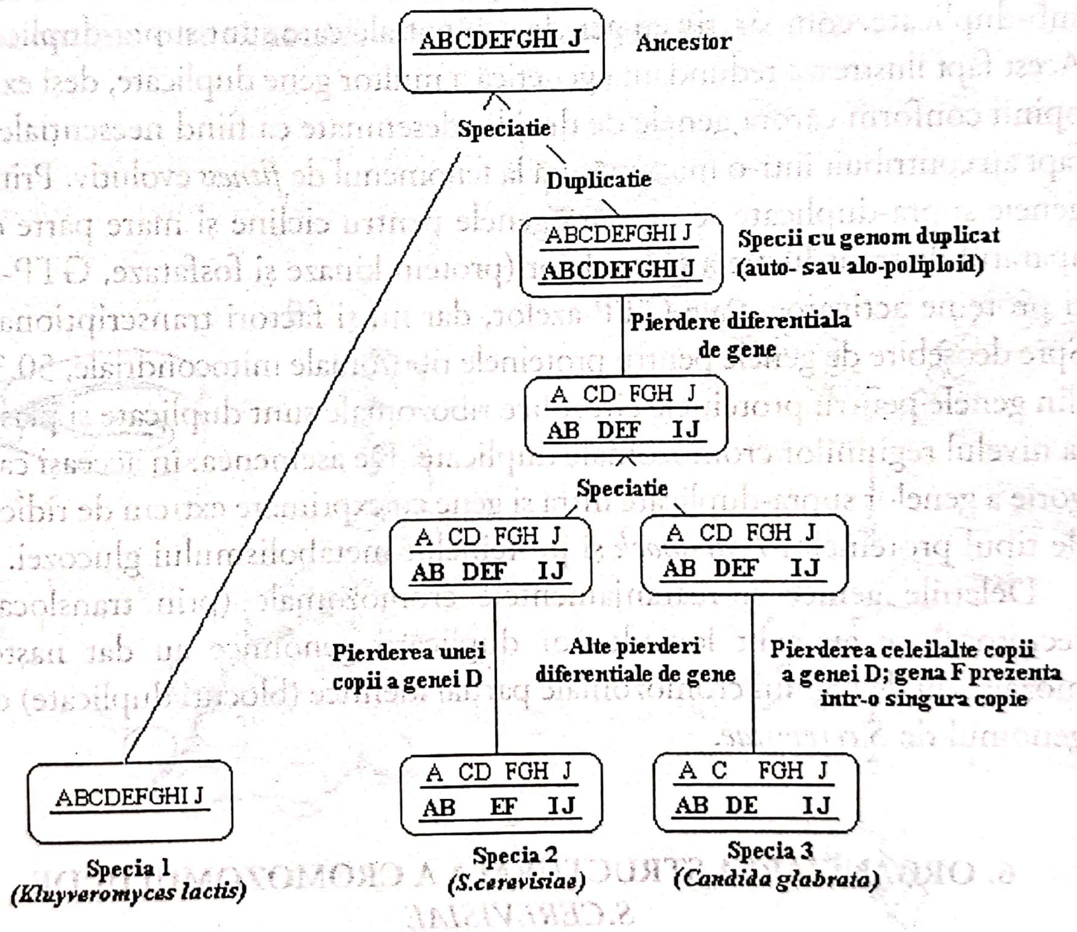

ABCDEFGHI J
Ancestor
Speciatie
Duplicatie
ABCDEFGHI J
ABCDEFGHI J
Specii cu genom duplicat
(auto- sau alo-poliploid)
Pierdere diferentiala
de gene
A CD FGH J
AB DEF IJ
Speciatie
A CD FGH J
AB DEF IJ
A CD FGH J
AB DEF IJ
Pierderea unei
copii a genei D
Alte pierderi
diferentiale de gene
Pierderea celeilalte copii
a genei D; gena F prezenta
intr-o singura copie
ABCDEFGHI J
A CD FGH J
AB EF IJ
A C FGH J
AB DE IJ
Specia 1
(Kluyveromyces lactis)
Specia 2
(S.cerevisiae)
Specia 3
(Candida glabrata)

Fig. 1 — Reprezentarea schematică a evoluției ordinii genice ce a urmat duplicației genomice. Specia 1 a evoluat divergent față de speciile 2 și 3, înaintea procesului de duplicație genomică. Speciile 2 și 3 au apărut în urma aceluiași eveniment duplicațional, suferind ulterior unele pierderi genice și unele pierderi specie-specifice (după Seoighe și Wolfe, 1999)

După duplicarea genică, ambele copii ale genei pot fi păstrate sau unul din membrii perechii de gene poate acumula mutații deletive sau poate fi pierdut. Păstrarea ambelor copii se pare că are două finalități evolutive: selecția în vederea creșterii exprimării și divergența funcției genice. Divergența funcțională poate fi produsă printr-o degenerare complementară, caz în care fiecare genă-fiică reține doar un subset din funcțiile genei parentale sau, mai rar, gena-fiică achiziționează o nouă funcție.

Estimativ s-a apreciat că ~8% din genele genomului pre-duplicat au fost reținute sub formă duplicată, astfel că perechile duplicate formate prin poliploidie ar reprezenta ~16% din setul actual de gene de la *S.cerevisiae*. Corelat cu aceasta, s-a stabilit că gene desemnate ca esențiale sunt sub-duplicate, comparativ cu genele neesențiale care sunt supra-duplicate. Acest fapt ilustrează redundanța genetică a multor gene duplicate, deși există opinii conform cărora genele de drojdie desemnate ca fiind neesențiale de fapt au contribuit într-o mică măsură la fenomenul de *fitness* evolutiv. Printre genele supra-duplicate se numără genele pentru cicline și mare parte din aparatul de transducție a semnalelor (protein kinaze și fosfataze, GTP-aze și proteine activatoare ale GTP-azelor, dar nu și factori transcripționali). Spre deosebire de genele pentru proteinele ribozomale mitocondriale, 50.3% din genele pentru proteinele citosolice ribozomale sunt duplicate și plasate la nivelul regiunilor cromozomale duplicate. De asemenea, în aceeași categorie a genelor supra-duplicate intră și gene cu exprimare extrem de ridicată de tipul proteinelor *heat-shock* și proteinelor metabolismului glucozei.

Delețiile genice și rearanjamentele cromozomale (prin translocație reciprocă) ce au avut loc ulterior duplicării genomice au dat naștere mozaicului de regiuni cromozomale parțial identice (blocuri duplicate) din genomul de *S.cerevisiae*.

6. ORGANIZAREA STRUCTURALĂ A CROMOZOMULUI DE *S.CEREVISIAE*

În celulele eucariote, inclusiv drojdii, ADN genomic este compactat într-un complex înalt condensat astfel că lungimea foarte mare a moleculelor de ADN poate fi menținută într-un spațiul restrâns reprezentat de sfera nucleului. Tot astfel, cromatina este organizată într-o ierarhie de structuri ce pornește de la unitatea structurală de bază – nucleosomul - și se termină cu individualizarea cromozomilor metafazici (Fig. 2).

Nucleosomul este compus dintr-un miez octameric ce conține câte două copii ale histonelor H2A, H2B, H3 și H4. Acest miez nucleosomal are 147pb ADN, răsucit în jurul lui în 1.65 ture ale unui superhelix. Fiecare nivel de organizare a cromatinei contribuie la împachetarea densă a ADN. De exemplu, histona H1 leagă ADN-ul *linker* dintre doi nucleosomi adiacenți, facilitând un grad mare de împachetare a nucleosomilor.

Acest nivel ridicat de compactare represează efectiv expresia genelor ca o consecință a formării nucleosomilor peste regiunile promotor. Prin urmare, toate procesele nucleare, inclusiv transcrierea ADN, necesită participarea unor enzime care să acceseze ADN-ul matriță (*template DNA*).

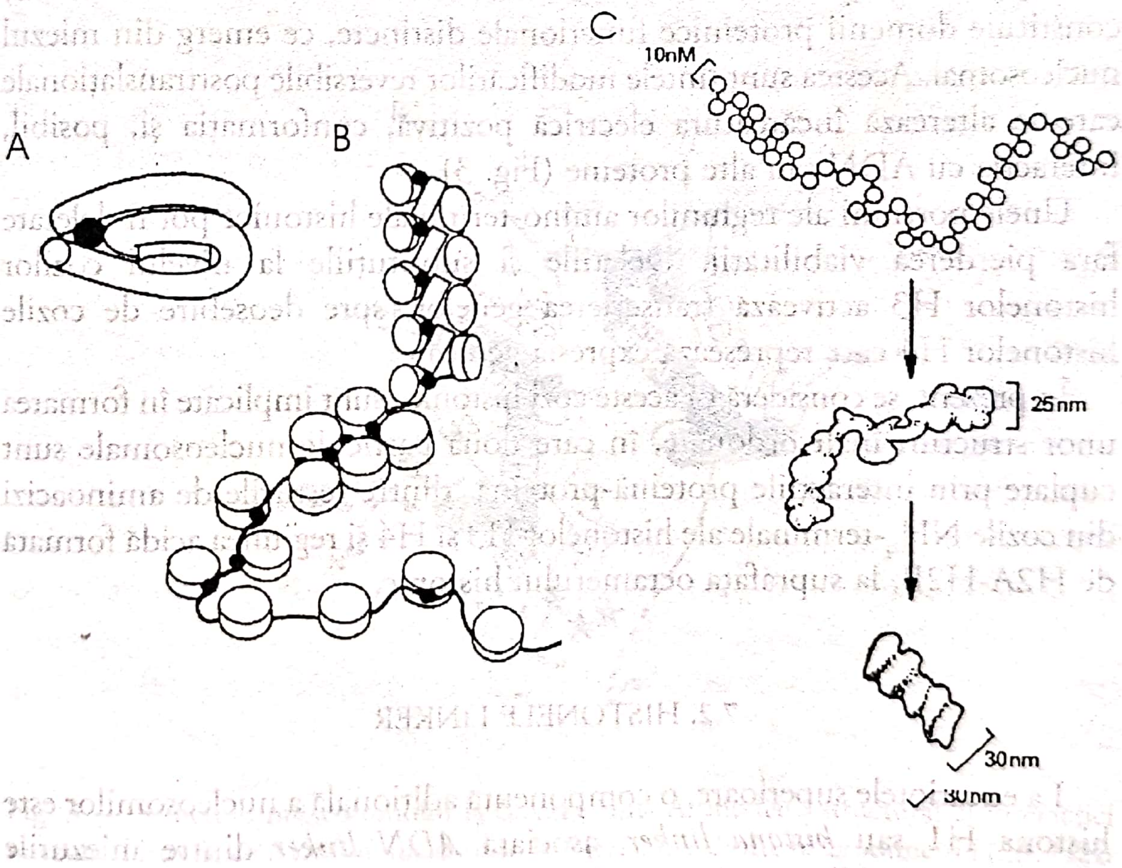


Fig. 2 — Nivele de împachetare a cromatinei. A. Nucleosom cu proteine asociate. B și C. Modelul formei ***'șirag de perle'*** a cromatinei, din care rezultă fibra de 30nm (după Wolffe, 1995).

7. ELEMENTE STRUCTURALE NUCLEOSOMALE

7.1. HISTONELE - ELEMENTELE MIEZULUI NUCLEOSOMAL

Fiecare histonă prezintă un domeniu asociat miezului nucleosomal (*histone fold*) și o coadă amino-terminală care emerge prin ADN-ul atașat. Acest domeniu central este implicat în interacțiile histonă-histonă din interiorul miezului nucleosomal și în intereacțiile histone-ADN. Unul din avantajele drojdiilor, pe lângă ușurința manipulării lor genetice, este reprezentat de prezența în doar două copii a genelor ce codifică histonele miezului *per* genom haploid, spre deosebire de genomul de la *Drosophila melanogaster* care posedă ~110 copii pentru fiecare genă.

Capetele histonelor

Regiunile NH_4^+-terminale ale histonelor (cozile histonelor – *histone tails*) constituie domenii proteinice funcționale distincte, ce emerg din miezul nucleosomal. Acestea sunt țintele modificărilor reversibile posttranslaționale care le alterează încărcătura electrică pozitivă, conformația și, posibil, interacția cu ADN sau alte proteine (Fig. 3).

Unele porțiuni ale regiunilor amino-terminale histonice pot fi deletate fără pierderea viabilității. Delețiile și subtituțiile la nivelul cozilor histonelor H3 activează transcrierea genelor, spre deosebire de cozile histonelor H4 care represează expresia genică.

În prezent, se consideră că aceste cozi histonice sunt implicate în formarea unor structuri înalt ordonate, în care două particule nucleosomale sunt cuplate prin interacțiile proteină-proteină dintre resturile de aminoacizi din cozile NH_4-terminale ale histonelor H3 și H4 și regiunea acidă formată de H2A-H2B, la suprafața octamerului histonic.

7.2. HISTONELE LINKER

La eucariotele superioare, o componentă adițională a nucleosomilor este histona H1 sau *histona linker*, asociată *ADN linker* dintre miezurile nucleosomale. Histona H1 facilitează împachetarea nucleosomilor în așa-numita "fibră de 30-nm" și stabilizează structura compactizată. Histona H1 este implicată și în represia transcripțională.

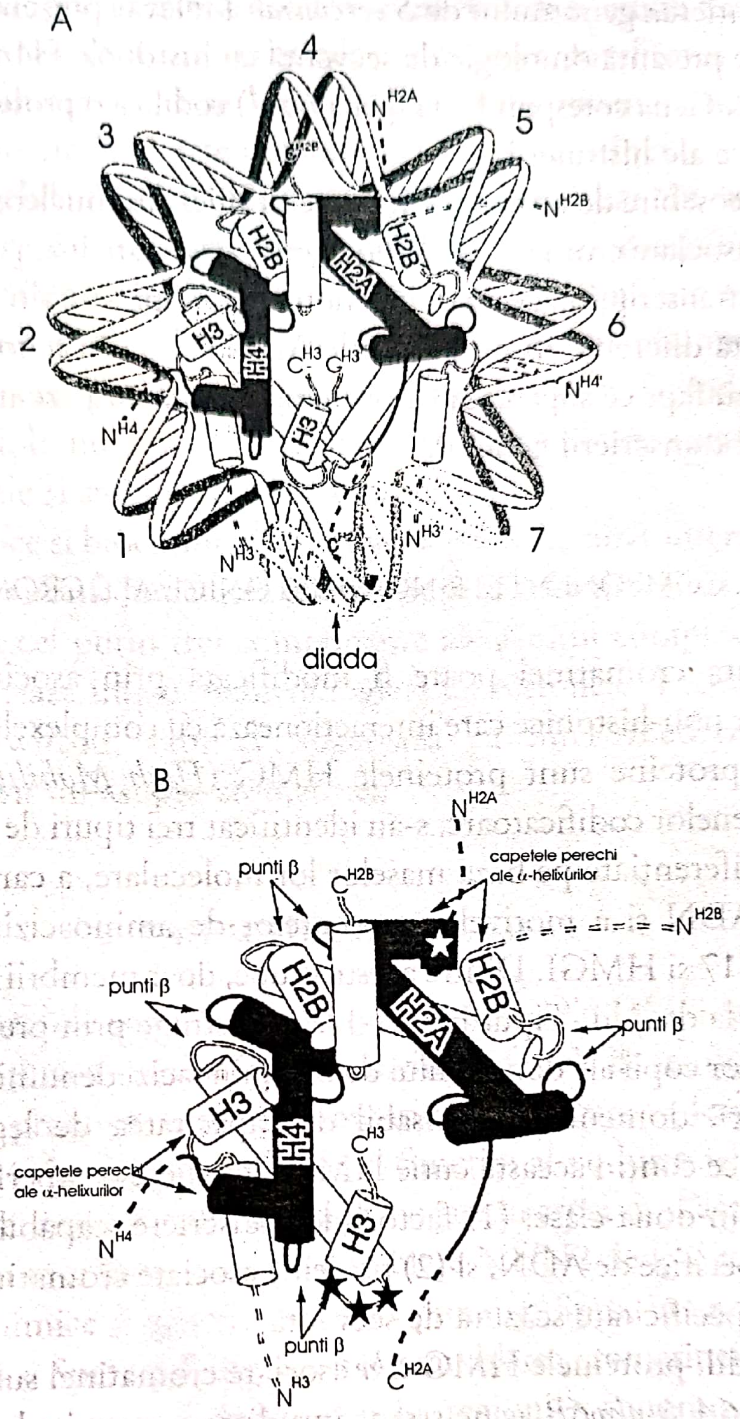

A
4
3
5
N^H2A
N^H2B
H2B
H2A
H2B
H3
H4
2
6
C^H3
C^H3'
N^H4'
N^H4
H3
1
7
N^H3
C^H2A
N^H3'
diada
B
N^H2A
punti β
capetele perechi ale α-helixurilor
C^H2B
N^H2B
H2B
H2A
H2B
punti β
punti β
H3
H4
C^H3
capetele perechi ale α-helixurilor
N^H4
H3
punti β
C^H2A
N^H3

Fig. 3 — Structura nucleosomului la ***S.cerevisiae***. A: modelul structural al interacţiei miezului histonic cu ADN în nucleosom. B: Interacţiile dintre heterodimerii H2A, H2B şi H3-H4. Situsurile interacţiei primare dintre domeniile "***histone fold***" cu ADN (capetele perechi ale helixurilor şi motivele punte-β). Domeniul SIN este localizat la nivelul regiunii "***knuckle***" a histonei H2A (după Martin, 1999).

Secvențierea genomului de *S.cerevisiae* a relevat prezența unui ORF cu regiuni ce prezintă omologie de secvență cu histonele H1 de la eucariotele superioare. Gena corespondentă (gena *hho1*) codifică o proteină cu trăsăturile biochimice ale histonei H1.

Spre deosebire de mutantele histonelor miezului nucleosomal sau a altor proteine asociate cromatinei, deleția genei *hho1* este incapabilă de supresia defectelor transcripționale de tipul fenotipurilor Spt^- sau Sin^-. Aceste mutante nu prezintă diferențe în proprietățile ADN și nici în fenomenele asociate cromatinei, fapt ce sugerează că proteina H1-*like* nu are un rol important în reglajul transcrierii genelor.

7.3. COMPONENTELE NON-HISTONICE ALE CROMATINEI

Structura cromatinei poate fi modificată prin asocierea selectivă a proteinelor non-histonice care interacționează cu complexele histone-ADN. Astfel de proteine sunt proteinele HMG (*H**igh* *M**obility* *G**roup*). Prin clonarea genelor codificatoare, s-au identificat trei tipuri de proteine HMG ce pot fi diferențiate pe baza maselor lor moleculare, a caracteristicilor de legare la ADN și a motivelor secvențelor de aminoacizi: HMG – 1/2, HMG-14/17 și HMGI. Dintre aceste grupe, doar membrii HMG-1/2 s-au descoperit la drojdii. Tipul HMG-1/2 se distinge prin prezența uneia sau a mai multor copii ale domeniului de 80 aminoacizi denumit “cutia HMG” (*HMG-box*), domeniu responsabil de capacitatea de legarea la ADN. Proteinele ce conțin această cutie HMG alcătuiesc o superfamilie ce poate fi divizată în două clase: (1) factori de transcriere, capabili să recunoască secvențe specifice de ADN, și (2) proteine asociate cromatinei, ce recunosc ADN cu specificitate scăzută de secvență.

La drojdii, proteinele HMG-*like* asociate cromatinei sunt codificate de genele *nhp6A* și *nhp6B*, gene strâns înrudite cu proteinele de 10-kDal ce conțin un singur domeniu HMG-box. Genele *hmo1* și *hmo2* codifică proteine înrudite ce conțin două domenii HMG-box contigue. Caracterizarea biochimică a tuturor celor patru proteine sugerează rolul lor de proteine HMG, fără a se fi evidențiat vreo implicare a lor în represia mediată de cromatină a transcrierii.

Proteina Sin1/Spt2 prezintă două regiuni de similitudine cu proteina HMG1 de la mamifere. Caracteristicile de secvență, localizarea nucleară, abundența și abilitatea de a se lega la ADN într-o manieră nespecifică, sugerează că proteina Sin1 este o componentă a cromatinei.

Întrucât nivelul ARNm Sin1 rămâne neschimbat în mutantele histonice, reducerea nivelului Sin1 are loc posttranscripțional, prin degradarea Sin1 necomplexată în cromatină. Domeniul amino-terminal al Sin1 interacționează cu Cdc23 și cu o proteină ce prezintă omologie cu familia AAA a componentelor proteosomului, acești factori afectând stabilitatea ADN. În nucleosom, proteina Sin1 interacționează atât cu ADN, cât și cu histonele și stabilizează nuclesomul.

Datele genetice și biochimice au arătat că proteina Sin1 interacționează cu complexul Swi/Snf, jumătatea carboxi-terminală a proteinei Sin1 fiind asociată fizic cu cel puțin trei componente ale acestui complex. Proteina Sin1 interacționează într-o manieră reglată cu histonele și componentele complexului Swi/Snf, fapt ce sugerează că Sin1 mediază efectele complexului Swi/Snf asupra cromatinei.

7.4. FACTORI ACCESORII

Pe lângă mutațiile genelor pentru histone și genele HMG, genele *spt4*, *spt5* și *spt6* sunt ținte ale mutațiilor care înving defectele de transcriere. Gena *spt6* codifică o proteină acidă de dimensiuni mari care se leagă direct la dimerul H3-H4, interacționând fizic și funcțional cu histonele. Proteina Spt6 conține trei regiuni puternic acide, bogate în aspartat și acid glutamic, care sunt prezente și în factorii de asamblare N1/N2 de la *Xenopus laevis*. Analizele biochimice și genetice arată că proteina Spt6, în combinație cu proteinele Spt4 și Spt5, ar fi implicată în asamblarea cromatinei sau ar servi ca donor sau acceptor al histonelor în regiunile genomice ce suferă reorganizări intense ale cromatinei, cum este cazul regiunilor prezente la nivelul genelor înalt reglate.

Proteina Spt5 interacționează funcțional și fizic cu ARN polimeraza II holoenzima (ARN polII) și această interacție se presupune a fi importantă pentru elongarea transcrierii *in vivo*.

7.5. DEACETILAZE HISTONICE (HDAC – *HISTONE DEACETYLASES*)

Capetele amino-terminale ale histonelor sunt ținte pentru modificările specifice de tipul acetilare, deacetilare, metilare, fosforilare și ADP-ribozilare. Creșterea nivelului de acetilare a histonelor la nivelul unei gene sau regiuni cromozomale este asociată cu activitatea transcripțională, în vreme ce deacetilarea histonelor este observată în regiunile inactive transcripțional, deacetilarea miezului histonic conducând la represia transcripțională. Prin urmare, deacetilazele histonice sunt caracterizate drept reglatori transcripționali negativi (Fig. 4).

La *S.cerevisiae* s-au identificat biochimic două complexe implicate în deacetilarea histonelor : complexul HAD (250Kdal) și complexul HDB (600Kdal). *In vitro*, complexul HAD deacetilează toate cele patru histone ale miezului nucleosomal. Printre genele ce codifică componentele acestor complexe este și gena *rpd3,* ce codifică una din subunitățile complexului HDB și care are rol de factor de reglare general. De asemenea, gena *hda1* codifică o subunitate a complexului HDA și prezintă o omologie de secvență

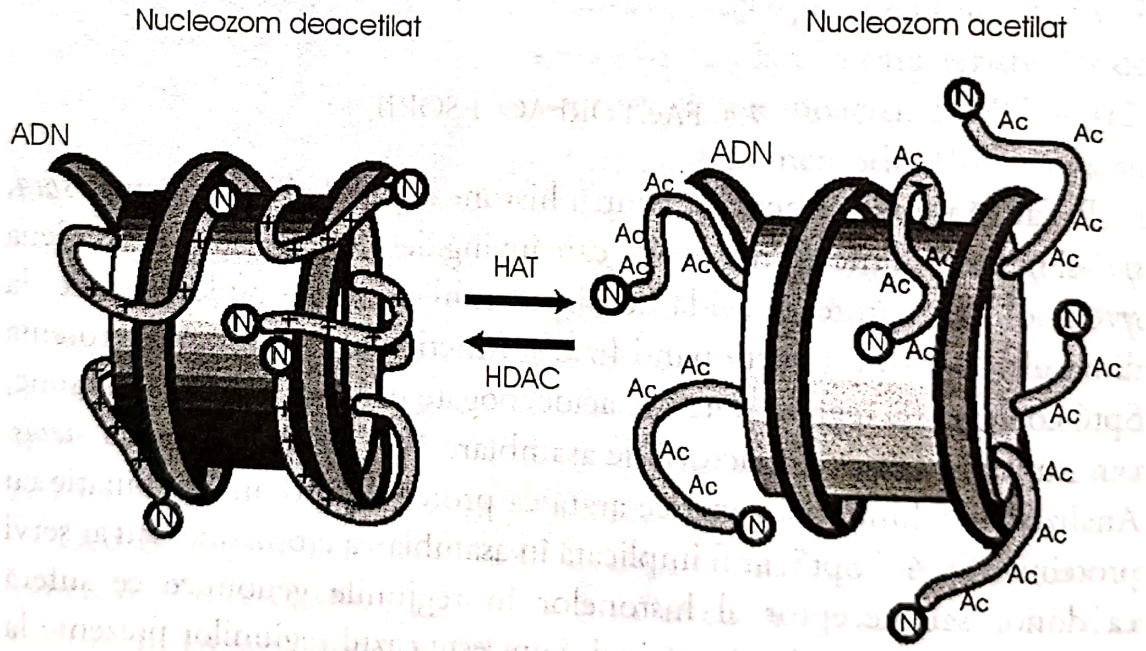


Fig.4 — Domeniile „coadă" amino-terminale ale celor patru histone "*core*" conțin resturi de lizină acetilate de către acetiltransferaze histonice (HAT - ***histone acetyltransferase***) și deacetilate de către HDAC (deacetilaze histonice - ***histone deacetylase***). N – capătul amino-terminal al histonelor individuale; Ac- resturile de lizină acetilate (după Hassig și Schreiber, 1997).

importantă cu gena *rpd3*. Histonele reprezintă substratul fiziologic pentru deacetilazele histonice Rpd3 și Hda1.

Pe lângă genele *rpd3* și *hda1*, s-a identificat și gena *prd1* care este alela genei *sin3*, ce codifica unul din supresorii complexului Swi/Snf. Proteinele Rpd3 și Sin3 interacționează și sunt componente ale complexului HDB. Complexul deacetilazic Rpd3-Sin3 acționează asupra unor promotori specifici prin interacția cu diferite proteine de legare la ADN. Astfel, proteina Ume6 interacționează cu proteina Sin3 și mediază represia transcrierii dependentă de Sin3/Rpd3, Rpd3 fiind cea care deacetilează restul Lys5 a H4.

7.6. ACETILAZE HISTONICE (HAT – *HISTONE ACETYLTRANSFERASE*)

Nucleosomul reprezintă, totuși, o structură extrem de dinamică ce recepționează diversele semnale din mediu, ce induc modificări ale structurii cromatinei și ale arhitecturii cromozomale ce facilitează transcrierea și replicarea ADN. Cozile amino-terminale ale celor patru histone ce alcătuiesc miezul nucleosomal sunt înalt conservate și conțin situri de acetilare post-translațională pe grupările ϵ-NH_4^+ ale resturilor specifice de lizină.

Acetilarea alterează interacțiile dintre cozile histonelor și ADN, afectând structura cromatinei și activitatea transcripțională. Nivelul ridicat de acetilare este asociat cu gene transcripțional active, histonele acetilate facilitând accesul factorilor de transcriere la nivelul siturilor de atașare la ADN (Fig. 5).

Acetilarea cozilor histonelor poate induce modificări alosterice în conformația nucleosomului și poate inhiba supraîmpachetarea nucleosomilor, ce sunt represivi la transcriere.

În celulele eucariote s-au descris două acetiltransferaze HAT majore (HAT - *H**istone* *A**cetyl**T**ransferase*) : enzima citoplasmatică HAT-B, implicată în acetilarea histonei H4 din ADN replicat, și enzima nucleară HAT-A, responsabilă de acetilarea asociată transcrierii.

La *S.cerevisiae*, HAT-B (HAT1) este alcătuită din două polipeptide : subunitatea catalitică Hat1 și subunitatea Hat2, componentă a factorului CAF1 de asamblare a cromatinei (CAF1 – *C**hromatin* *A**ssembly* *F**actor 1*).

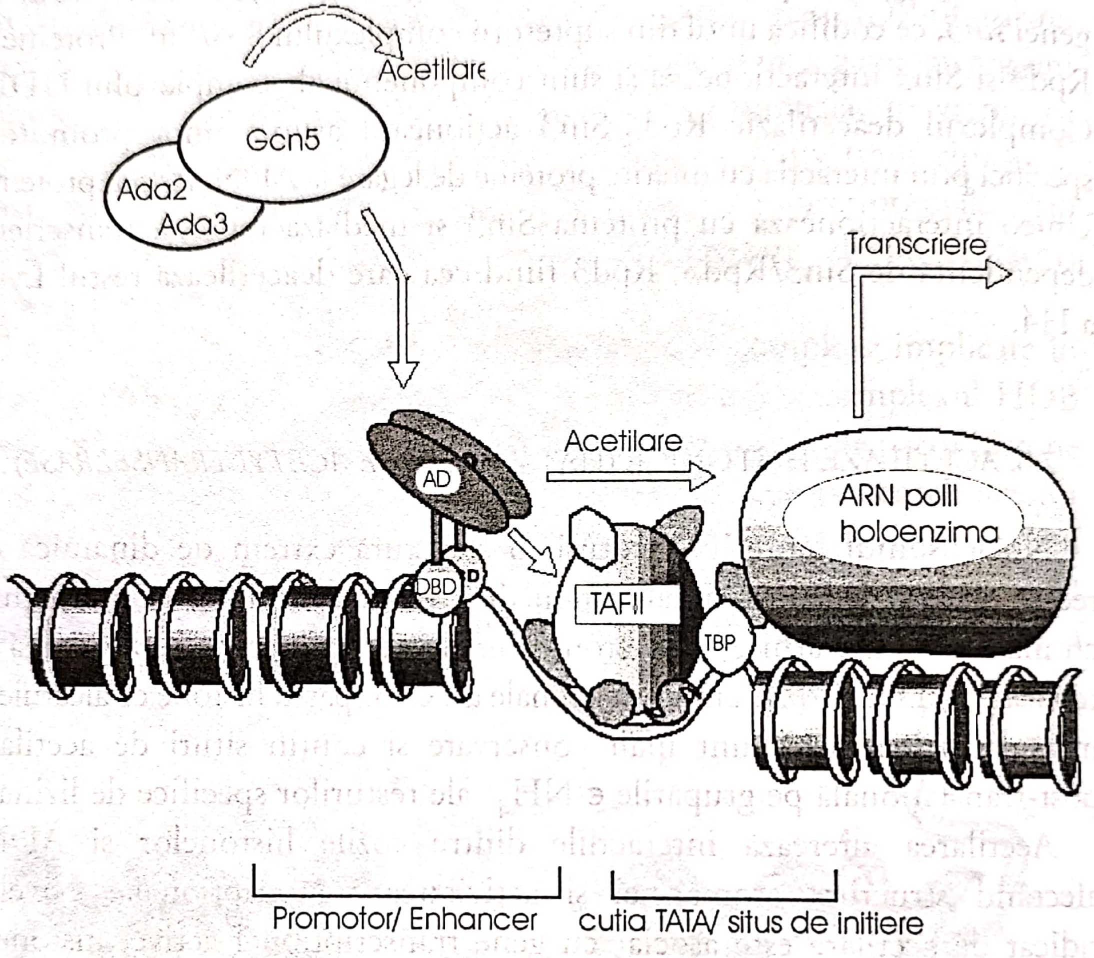

Acetilare
Gcn5
Ada2
Ada3
Transcriere
Acetilare
AD
DBD
D
TAFII
TBP
ARN polII
holoenzima
Promotor/ Enhancer
cutia TATA/ situs de initiere

Fig. 5 — Acetilazele histonice (HAT) sunt asociate cu diverse componente ale mașinăriei transcripționale. De exemplu, factorul de transcriere TAFII leagă ADN la nivelul ***Enhancer***-ului sau se atașează la nivelul promotorului din vecinătatea cutiei TATA și a siturilor de inițiere a transcrierii de către ARN polimeraza II holoenzima. După atașarea ***via*** domeniul de legare la ADN (DBD - ***DNA binding domain***), TAFII recrutează direct/indirect co-activatorii la situri ADN specifice utilizând domeniul său de activare (AD-***activation domain***). La drojdii, acetilaza histonică Gcn5 se asociază cu proteinele Ada2/3 și formează un complex coactivator transcripțional ce țintește promotorii specifici prin asocierea cu factori de transcriere specifici. De exemplu, activitatea Gcn5 este asociată și cu TAFII – componentă a subunității TFIID din complexul de pre-inițiere a transcrierii, compusă din proteine de legare la cutia TATA (TBP-***TATA binding proteins***) și numeroși factori asociați TBP. Acetilarea nucleosomilor de către HAT stimulează transcrierea de către ARN pol II holoenzima la nivelul matriței nuclesomale (după Hassig si Schreiber, 1997).

8. ASAMBLAREA CROMATINEI

Reasamblarea nucleosomilor pe catenele ADN nascente rezultate în urma replicării, este un eveniment alcătuit din două procese esențiale: (1) ruperea tranzientă a nucleosomilor parentali în cursul pasajului bifurcației de replicare, cu reasamblarea lor ulterioară în două catene ADN-fiice, printr-un mecanism analog transferului nucleosomilor după transcriere, și (2) asamblarea activă a nucleosomilor pe catenele-fiice din histone nou sintetizate, asamblare *de novo* mediată de factori ce refac complementul întreg al nucleosomilor pe ADN replicat. Acest proces de asamblare a nucleosomilor după replicare este el însuși un proces în două etape ce reflectă structura fizică a nucleosomului: în etapa inițială are loc depoziția unui tetramer al histonelor H3 și H4, urmată de depoziția unei perechi de dimeri ai histonelor H2A și H2B, cu reconstituirea nucleosomului (Fig. 6.).

Prima etapă în asamblarea cromatinei o constituie sinteza histonelor în citoplasmă, în cursul fazei S. Ulterior, histonele nou sintetizate sunt modificate înainte de depunerea lor la situsurile de replicare. Una din cele mai importante modificări ce au loc în cursul fazei S este acetilarea cozilor amino-terminale ale histonelor H3 și H4. Această acetilare este non-randomică și conservată evolutiv. Histona H4 posedă la capătul amino-terminal 4 resturi de lizină (K5, K8, K12 și K16) ce pot fi acetilate, histona H4 nou sintetizată fiind acetilată la resturile K5 și K12. Acetilarea histonelor H4 libere se realizează ulterior transportului din citoplasmă în nucleu, sub acțiunea acetil-transferazei HAT1 localizată predominant în nucleu. HAT1 este un heterodimer alcătuit dintr-o subunitate catalitică Hat1 și o subunitate reglatoare Hat2. Deși subunitatea catalitică este capabilă să acetileze histonele H4 libere la ambele resturi K5 și K12, heterodimerul Hat1/Hat2 poate acetila doar restul K12, subunitatea reglatoare având rol în prezentarea substratului enzimei.

Asamblarea nucleosomilor pe ADN nou replicat este mediată de complexul CAF1 (*Chromatin Assembly Factor1*) – complex de proteine ce utilizează histone H3 și H4 modificate specific. La drojdii, CAF1 este un heterotrimer alcătuit din subunitățile Cac1, Cac2 și Cac3. Subunitatea Cac3 leagă histona H4, acetilarea histonelor putându-se realiza înainte sau după legarea lor la CAF1, dar obligatoriu inainte de depunerea histonelor pe ADN.

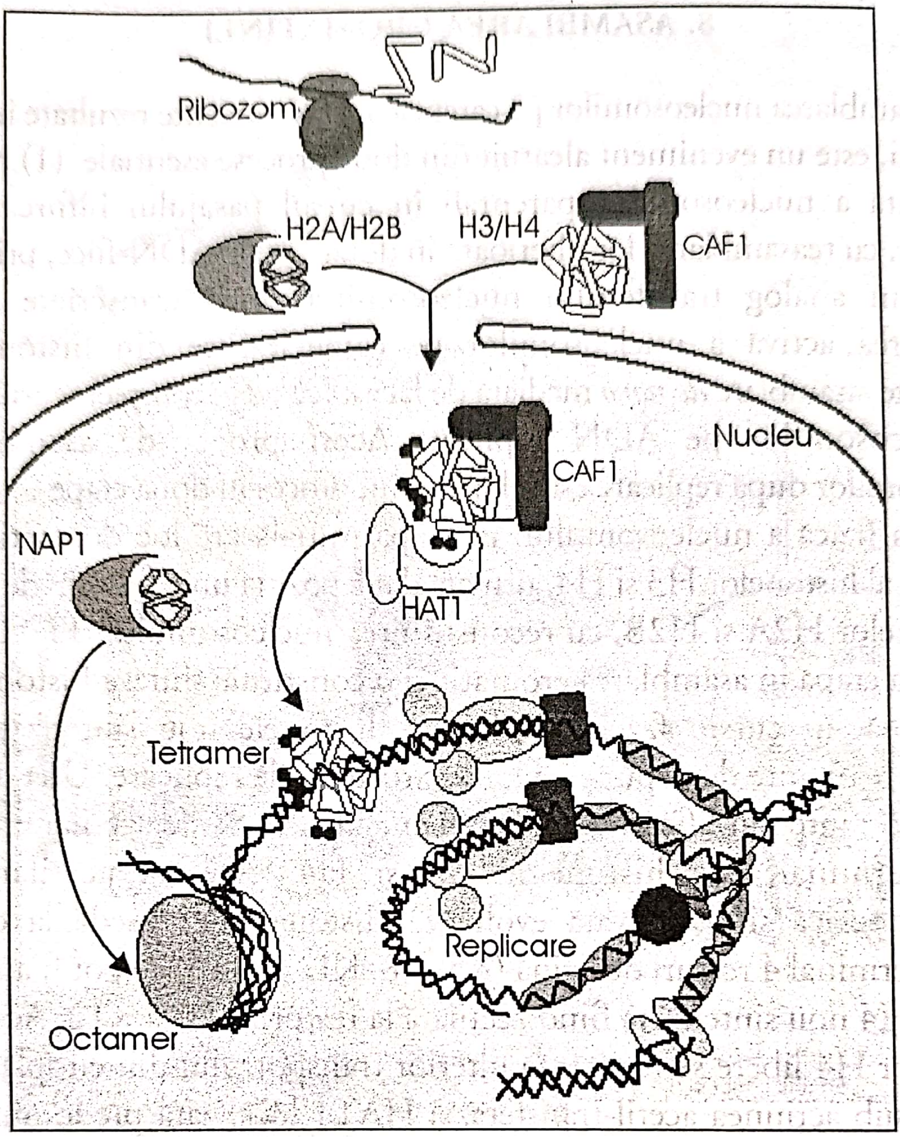


Fig. 6 — Reprezentarea schematică a asamblării ***de novo*** a nucleosomilor în cursul fazei S a ciclului celular (după Adams și Kamakaka, 1999).

Asamblarea dependentă de CAF1 are loc prin recunoașterea preferențială a ADN-ului nou replicat, recunoaștere ce presupune implicarea unei proteine de replicare (ADN helicaza, proteina RPA sau PCNA), depunerea histonelor mediată de CAF1 nefiind dependentă de deplasarea bifurcației de replicare.

După depunerea mediată de CAF1 a histonelor H3 și H4, are loc legarea histonelor H2A și H2B, cu formarea miezului nucleosomal. *In vivo*, depunerea H2A/H2B este mediată de proteina Nap1 (*Nucleosome assemby protein 1*). Localizarea Nap1 în celulă este dinamică: citoplasmatică, în cursul fazei M, și nucleară, în faza S, fapt ce demonstrează rolul multiplu al acestei proteine în ciclul celular.

După depunerea histonelor miezului nucleosomal, cromatina nascentă suferă un proces de maturare, manifestat prin apariția nucleosomilor spațiați regulat, rezistența la digestia cu DN-azaI, deacetilarea histonei H4 și legarea histonei H1. Asamblarea nucleosomilor spațiați necesită ATP, factorul ACF (*ATP-utilizing Chromatin assembly and remodeling Factor*) fiind una din componentele mașinăriei de asamblare a cromatinei. La acestea se adaugă histonele miezului nucleosomal, ADN și o proteină precum Nap1 sau Caf1. Factorul ACF este compus din 4 polipeptide, subunitatea Isw1 fiind o ATP-ază nucleosomal-dependentă ce spațiază corect nucleosomii prin mobilizarea lor. În ceea ce privește rolul ATP în formarea cromatinei mature, se pare că fosforilarea histonei H2A este corelată cu spațierea cromatinei în cursul asamblării nucleosomale.

9. CROMATINA SILENȚIATĂ LA DROJDII

Genomul eucariot este organizat în domenii funcționale discrete în care expresia genelor este represată sau facilitată. Domeniile în care genele sunt represate sunt definite în mod obișnuit ca *heterocromatină*, spre deosebire de domeniile ce permit exprimarea genelor și care definesc *eucromatina*. Heterocromatina este o cromatină cu o structură mult mai compactă decât eucromatina și conține complexe proteinice ce se propagă de-a lungul fibrei de cromatină pentru a silenția genele prezente în această structură. Eucromatina și heterocromatina se interpun de-a lungul cromozomului.

Genomul de *S.cerevisiae* conține domenii de cromatină prezentă într-o stare asemănătoare heterocromatinei (*heterochromatin-like state*) din cromozomii eucariotelor superioare, cromatină denumită *cromatină silențiată*. Aceste domenii cromozomale sunt localizate la nivelul telomerelor (TEL) și în vecinătatea locilor HM de împerechere, silențiați. Ca rezultat al condensării, această cromatină este târziu replicată, iar histonele H4 sunt hipo-acetilate, cu excepția acetilării lizinei din poziția K12. Ca o consecință, TEL pot represa epigenetic genele adiacente printr-un efect de poziție a telomerei (*TPE-Telomere Position Effect*).

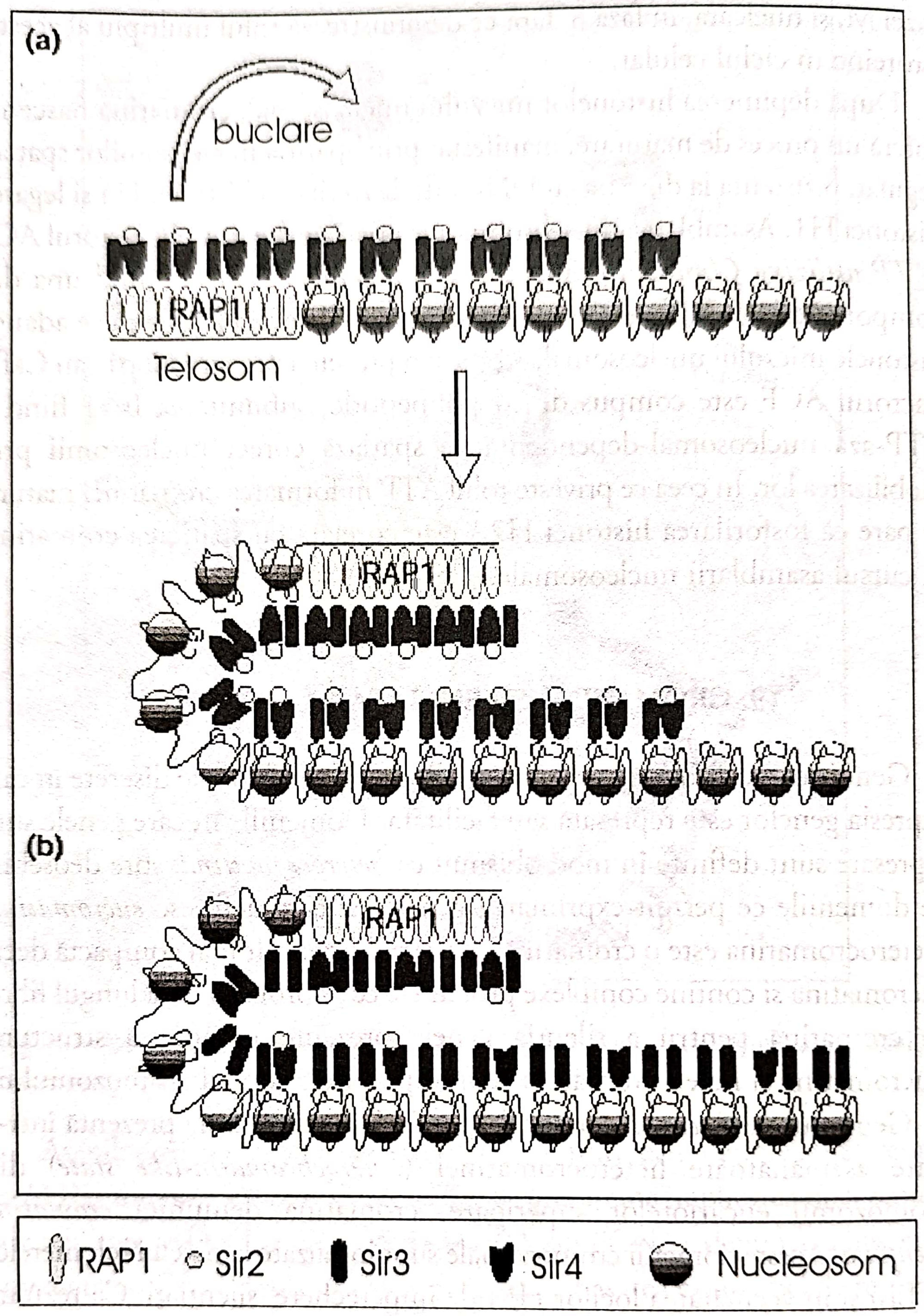

(a)
buclare
RAP1
Telosom
RAP1
(b)
RAP1
RAP1
Sir2
Sir3
Sir4
Nucleosom

Fig. 7 — Modelul de formare a heterocromatinei telomerice. (a) Telosomul ce conține RAP1 se buclează pe regiunile subtelomerice. În această manieră, interacțiile RAP1-**SIR**-histone sunt esențiale pentru stabilitatea complexului telosomal. (b) Ca urmare a supraexprimării, prezența proteinei Sir3 se extinde la 16-20kpb față de TEI. (după Grunstein, 1997).

Numeroase analize genetice au arătat că, la drojdii, TEL și locii silențiați HM prezintă un număr de factori necesari represiei genelor adiacente. Acești factori includ proteina RAP1 (*Repressor Activator Protein 1*), proteinele reglator Sir2, Sir3 si Sir4 (*Silencing Information Regulators* – reglatori ai informației silențiate) și secvențele amino-terminale ale histonelor H3 și H4.

Funcțiile proteinei RAP1 și ale histonei H4 depind de contextul lor în genom. De exemplu, proteina RAP1 funcționează ca represor pe heterocromatină și ca activator la nivelul a numeroase gene prezente în eucromatină, cele două funcții fiind determinate de diferite domenii ale proteinei. Proteina RAP1 recunoaște elementele *cis-acting* ale locilor HM și ale TEL. În cazul TEL, RAP1 se leagă la o regiune de ~300pb conținând repetiții $C_{1-3}A$ care ajută la formarea unei structuri de tip telosom non-nucleosomal (*non-nucleosomal telosome*). RAP1 este singurul represor ce recunoaște secvențe ADN specifice, funcția sa fiind de a recruta, prin domeniul carboxi-terminal, complexul Sir2-4 la heterocromatină, într-o manieră dependentă de domeniul amino-terminal al histonei H4 (Fig. 7.).

Coada amino-terminală a histonei H4 ce emerge din miezul nucleosomal este implicată în represia heterocromatinei și în activarea genelor eucromatinei. În cromatina silențiată, resturile de Lys din cozile amino-terminale ale histonelor H3 și H4 nu sunt acetilate. Proteinele Sir3 și Sir4 intercaționează cu aceste cozi nemodificate și, impreună cu Sir2, se asociază într-un complex ce determină condensarea ADN nucleosomal într-o stare asemănătoare heterocromatinei. Deci, domeniul carboxi-terminal al RAP1 și domeniul amino-terminal al H4 silențiază heterocromatina prin interacția cu factorii mașinăriei de silențiere.

Proteinele Sir intercaționează preferențial cu heterocromatina. Proteinele Sir2 și Sir4 sunt esențiale pentru atașarea Sir3. După interacția cu heterocromatina, are loc o supraexprimare a proteinei SIR3 ce formează un complex care se extinde de la 2-4kpb la 16-20kpb fața de TEL, determină pierderea parțială de proteine Sir4 și îndepărtarea totală a proteinelor Sir2.

O dată format, telosomul se buclează pe regiunile subtelomerice facilitând interacțiile RAP1-Sir3-H4.

10. PROTEINELE SIR - MEDIATORI AI SILENȚIERII TRANSCRIPȚIONALE

Reglarea expresiei genelor la nivel transcripțional este guvernată de acțiunile proteinelor specifice asupra promotorilor individuali ca și de inactivarea regională a domeniilor cromozomale. Această ultimă formă a represiei implică structuri de cromatină specializate responsabile pentru inactivarea constitutivă a genelor și pentru inactivarea controlată în caile de reglare a dezvoltării. În ambele situații, starea de represie este propagată într-o formă ereditară de la un ciclu celular la altul.

S. cerevisiae a servit ca model de studiu al efectelor de poziție ale genomului, la această drojdie inactivarea regională a transcrierii fiind denumită *silențiere transcripțională* – fenomen foarte bine caracterizat pentru TEL și locii silențiați HM, unde represia necesită un set de componente asociate cromatinei cunoscute ca proteine Sir. Structurile formate de aceste proteine prezintă unele asemanări funcționale cu heterocromatina de la eucariotele superioare.

Silențierea transcripțională implică o structură specializată a cromatinei, denumită cromatină silențiată, ce impiedică transcrierea dar și alte tranzacții fiziologice ale ADN, inclusiv (1) inițierea replicării ADN, (2) controlul tipului de împerechere haploid, prin inhibarea transcrierii și clivajului de către endonucleaza HO la nivelul locilor silențiați HMR și HML, ce conțin copii ale genelor pentru tipul de împerechere **a** și **α**, ca și (3) reglarea prin silențiere a genelor proximale TEL, fenomen cunoscut ca efect de poziție a TEL, structura represată a cromatinei TEL având rol în menținerea integrității capetelor cromozomului (Fig. 8).

Depozitarea complexului proteinic Sir la nivelul cromatinei este controlată de două tipuri de elemente *cis-acting* reglatoare: silențiatori (*silencers*) și elemente de graniță (*boundary elements*). Silențiatorii conțin diferite combinații ale situsurilor de legare pentru RAP1, Abf1 și complexul de recunoaștere a originii ORC (*Origin Recognition Complex*). Silențiatorii cooperează între ei și cu proteina Sir1, în vederea recrutării de alte proteine Sir, care apoi se asamblează cu histone formând cromatina silențiată. La nivelul TEL, situsurile de legare RAP1 din interiorul secvențelor telomerice terminale servesc silențiatorilor la recrutarea complexului Sir. Situsurile Abf1 și ORC din repetițiile subtelomerice adiacente ajută la propagarea domeniului silențiat de-a lungul regiunii subtelomerice.

Demarcarea granițelor depunerii proteinelor Sir este controlată de o serie de factori. Silențiatorii ce flanchează locusul HML impun silențierea într-o manieră direcționată, pe o distanță limitată, represând doar genele existente între aceștia. În domeniile subtelomerice, situsurile Abf1 și ORC sunt presărate cu regiuni subtelomerice de anti-silențiere STAR (*Subtelomeric Anti-silencing Regions*) ce acționează ca elemente de graniță. Aceste elemente STAR limitează propagarea rapidă a cromatinei telomerice silențiate și creează discontinuități în interiorul domeniului. Elementele STAR delimitează și domeniul de cromatină silențiată la locusul HMR.

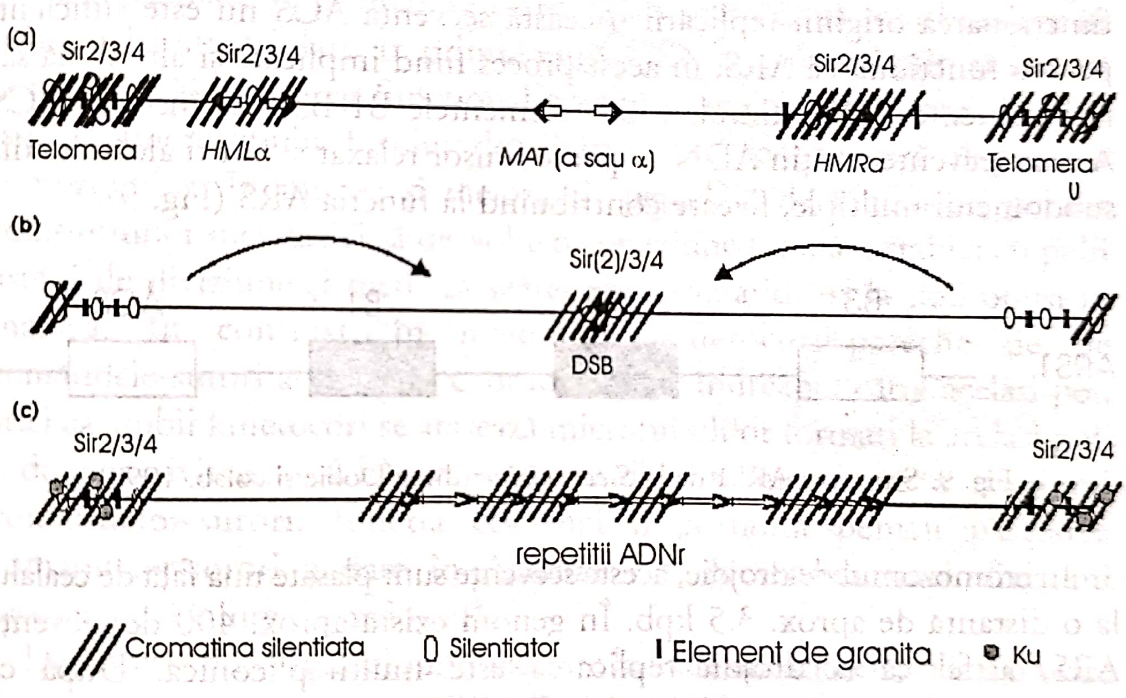


Fig. 8 — Reprezentarea distribuției proteinelor **Sir** și cromatina silențiată în genomul de ***S.cerevisiae.*** (a) Cromozomul III conține locii silențiați HMI**α** si HMRa și locusul activ pentru tipul de împerechere ***MAT***, care posedă una din copile genelor pentru tipul de împerechere (a sau **α**). HMRa este flancat de silențiatori și elemente de delimitare, în vreme ce locusul HMI**α** este flancat doar de silențiatori. Proteina Ku se leagă la capetele cromozomului, ca și la nivelul situsurilor prezente de-a lungul cromatinei telomerice silențiate. (b) Cromozom cu o ruptură dublu-catenară (DSB). Proteinele **Sir** și Ku sunt eliberate de la capetele tuturor cromozomilor și se relocalizează la nivelul situsului de rupere. (c) Cromozomul XII conține locusul ADNr, cromatina silențiată fiind prezentă la nivelul repetițiilor ADNr (după Gartenberg, 2000).

11. ORGANIZAREA FUNCȚIONALĂ A CROMOZOMULUI DE LA *S.CEREVISIAE*

Secvențele de replicare autonomă (ARS – *Autonomously Replicating Sequences*)

Identificate inițial ca secvențe de replicare capabile să asigure menținerea extracromozomală a plasmidelor de drojdie, studiile ulterioare au arătat că secvențele ARS servesc la direcționarea replicării ADN în cromozomii nativi, inițierea replicării la nivelul acestor secvențe realizându-se bidirecțional.

În principiu, secvențele ARS de la drojdii sunt regiuni ADN de ~150pb ce conțin o secvență consensus ACS (*ARS Consensus Sequence*) conservată evolutiv, cu o lungime de 11pb și bogată în AT, esențială pentru funcționarea originii replicării. Această secvență ACS nu este suficientă pentru funcționarea ARS, în acest proces fiind implicate și alte două sau trei elemente ADN stimulatorii – elementele B1-B3 - ce însoțesc ACS. Aceste secvențe conțin ADN ce poate fi ușor relaxat și pot fi alcătuite din subdomenii multiple, fiecare contribuind la funcția ARS (Fig. 9).

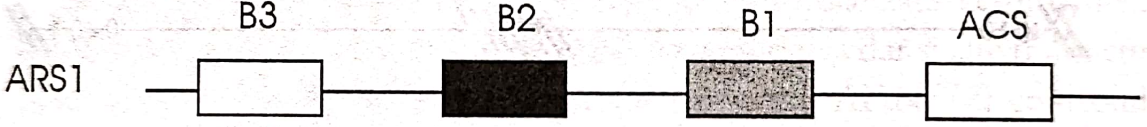


Fig. 9. Structura ARS1 de la **S.cerevisiae** (după Dobie și colab. 1999).

În cromozomul de drojdie, aceste secvențe sunt plasate una față de cealaltă la o distanță de aprox. 3.5 kpb. În genom există aprox. 400 de secvențe ARS, astfel că la drojdii replicarea este multirepliconică. După ce cromozomul s-a replicat, ADN-ul va fi complexat cu histone, compactarea impiedicând recunoașterea ADN-ului de către enzimele replicării.

12. CENTROMERII (CEN)

12.1. DEFINIREA GRANIȚELOR UNUI CEN EUCARIOT

CEN este o entitatea citogenetică aflată la nivelul constricției primare a cromozomului și care servește ca situs de atașare a cromozomilor la fusul de diviziune. Analize detaliate au relevat faptul că CEN conține ADN centromeric asociat cu o structură proteinică denumită *kinetocor* care, la rândul său, interacționează cu microtubulii fusului de diviziune. CEN este caracterizat ca fiind o structură stabilă și extrem de plastică, cu o diversitate a secvențelor ADN centromerice extrem de mare între diferite specii. Acest comportament al CEN – stabilitatea și plasticitatea sa - conduce la ideea că structura și funcționarea CEN ar fi dictate de un mecanism epigenetic, auto-propagabil, care necesită *imprinting*-ul ADN sau a constituenților proteinici.

CEN este o regiune *cis-acting* esențială, prezentă în toți cromozomii celulelor eucariote. Cromozomii acentrici segregă randomic în cursul diviziunii celulare și, în final, se pierd. CEN joacă două roluri majore în cursul diviziunii celulare. În primul rând, CEN este situsul primar pentru formarea unui kinetocor funcțional, care este un complex proteinic ce se leagă la microtubulii fusului de diviziune și coordonează deplasarea cromozomilor. În mitoza și meioza II, perechile de kinetocori permit cromozomilor metafazici să dezvolte o conexiune bipolară stabilă cu polii fusului de diviziune și mediază segregarea cromatidelor la poli opuși în Anafaza. În contrast, în meioza I, kinetocorii-pereche de pe cromatidele-surori acționează coordonat și se îndreaptă către același pol, astfel că ambii kinetocori se atașează microtubulilor formați la același pol. A doua activitate a CEN este de stabilire și menținere a coeziunii cromatidelor-surori, funcția cea mai importantă pentru păstrarea cromatidelor-surori atașate în Anafaza I și prevenirea unei diviziuni ecvaționale, înainte de meioza II.

Deși aceste două funcții sunt necesare la toate eucariotele, există o mare diversitate organizatorică a CEN la drojdii (*S.cerevisiae* și *S.pombe*) și eucariotele superioare. *S.cerevisiae* posedă CEN mici, dependenți de secvență, în vreme ce eucariotele superioare au domenii centromerice largi caracterizate prin secvențe ADN repetitive.

Din punct de vedere organizatoric, cel mai simplu CEN este prezent la cromozomii de drojdii. CEN constau dintr-o regiune “*miez*” de 160-220pb similară tuturor celor 16 cromozomi din setul haploid. Acest miez conține trei elemente ADN: CDEI, CDEII și CDEIII, esențiale pentru funcția CEN atât în mitoză cât și în meioză. În contrast, CEN celor trei cromozomi din nucleul celulei haploide de *S.pombe* măsoară între

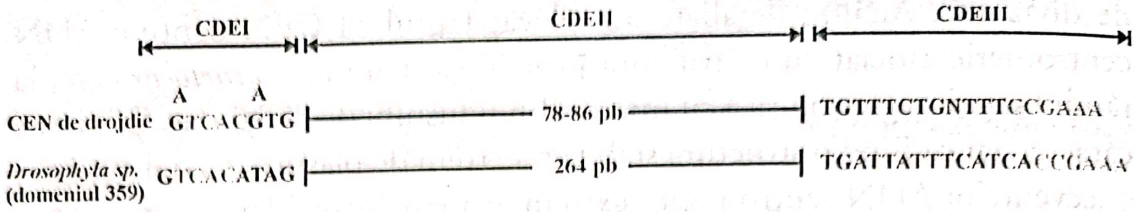


Fig. 10 — Secvența CEN de la drojdie. Regiunea CDEII din aceasta, deși variabilă în secvență la diferiți centromeri, are o lungime constantă și este bogată în resturi de A și T. În comparație, o secvență simplă de ADN de la ***Drosophila sp.*** localizată în vecinatatea CEN prezintă o unitate repetitivă cu o oarecare omologie de secvență cu CEN de drojdie, prin secvențe de 4pb și 6pb (în gri) (după Lodish și Baltimore, 1995).

40-200kpb și este alcătuit din elemente repetitive centromer-specifice aranjate în repetiții inverse ce flanchează miezul central centromeric (Fig. 10).

La eucariotele superioare, CEN poate măsura între 400kpb (*Drosophila sp.*), fiind alcătuit din heterocromatină constitutivă ce include secvențe satelit repetitive și elemente transpozabile, și 2-4Mpb la mamifere (ADN α-satelit alcătuit din copii ale repetiției de 171pb, repetițiile α-satelitului fiind capabile de stabilirea *de novo* a unui CEN în cazul construirii de minicromozomi). O trăsătură constantă în cazul CEN tuturor eucariotelor este asocierea cu ADN-ul satelit (excepție face *S.cerevisiae*) și tendința de a conține secvențe bogate în AT. La *S.cerevisiae*, aceleași secvențe ADN conferă coeziune și funcție kinetocorului, situație nevalabilă în cazul eucariotelor superioare, ce au CEN mai complecși, în care diferite secvențe pot localiza complexul kinetocoral și stabili situsurile coeziunii cromatidelor-surori.

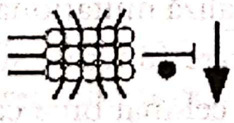
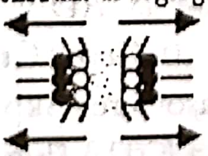
La eucariotele superioare, identitatea CEN este determinată de o serie de factori precum structura înalt ordonată a ADN, proteinele cromatinei specifice CEN, modificări precum acetilarea histonelor și *timing*-ul de replicare.

12.2. PROTEINE CENTROMERICE

Distribuția corectă a cromozomilor în cursul mitozei și meiozei este esențială pentru dezvoltarea normală a organismelor și pentru transmiterea trăsăturilor genetice. O distribuție aberantă a cromozomilor conduce la aneuploidie, definită ca o deviație a complementului cromozomal normal.

CEN este o structură stabilă alcătuită din secvențe *cis-acting* de ADN centromeric și din proteine *trans-acting*. Proteinele centromerice pot fi împărțite în două mari clase: (1) proteinele de arhitectură, ce contribuie la structura CEN și a cromatinei centromerice, proteine responsabile de formarea kinetocorului și putând regla funcțiile prezentate de regiunea CEN (condensarea și coeziunea cromatidelor-surori) și (2) proteinele kinetocorului, ce funcționează pentru promovarea captării microtubulilor (MT), congresia cromozomilor, rezoluția coeziunii cromatidelor-surori, deplasarea acestora către polii opuși și coordonarea segregării cromozomilor în raport cu ciclul celular (Tabel 1.).

Tabel 1. Proteine cu funcții centromerice la drojdiile *S.cerevisiae* și *S.pombe* (după Dobie și colab. 1999).

Functie	*S.cerevisiae*	*S.pombe*
Structura 	proteinele Cse4, Cbf1, p110 (Ndc10) p64 (Cep3) p58 (Ctf13) p23 (Skp1) Mif2	proteina Swi6
Coeziunea cromatidelor-surori 	proteina Scc1/Mcd1 SMC-uri	proteina Mis6
Captarea microtubulilor si congresie 	proteina Cbf5 (?)	proteina Clp1 proteina Swi6
checkpoint M-A 	proteinele BUB1-3, MAD 1-3, Cdc20, Cdc27	proteinele BUB1, MAD1, Slp1
Rezolutie si segregare 	proteinele Pds1, Esp1, Clb2	proteinele Cut1, Cut2

Contribuția ADN *cis-acting* la asamblarea kinetocorului în diferite organisme este neuniformă. De exemplu, la *S.cerevisiae*, situsul de asamblarea a kinetocorilor este precis fixat, cele 125pb (elementele CDEI, II și III) fiind suficiente pentru medierea atașării fusului de diviziune și coeziunii cromatidelor-surori. În contrast, CEN la *S.pombe* sunt definiți prin structuri moderat repetitive de 40-120kpb.

Diversitatea secvențelor ADN centromeric este acompaniată, la diferite specii, de o slabă omologie între proteinele de legare la ADN dar, întrucât aceste elemente structurale sunt împărțite in componente funcționale (proteine *motor* și proteine *checkpoint*), un nivel ridicat de secvență și conservarea funcțională devin evident. În plus, transmiterea cromozomilor și coordonarea acestui proces ciclului celular este un mecanism complicat și dinamic, ce implică numeroase interacții tranzitorii proteine-centromer și rețele de proteine a căror funcție acompaniază spectrul larg de funcții îndeplinite de CEN. Mai mult, kinetocorii sunt elemente centrale pentru asamblarea complexelor CPC de proteine ***checkpoint*** (***Checkpoint Protein Complexes***), ce interacționează cu complexul APC de inițiere a anafazei (APC-***Anaphase-Promoting Complex***) pentru a coordona transmiterea cromozomilor o dată cu ciclul celular.

12.3. PROTEINE STRUCTURALE CENTROMERICE

Spre deosebire de celelalte eucariote, CEN de la *S.cerevisiae* conține secvențe ADN specifice, conservate la toți cei 16 cromozomi. Multe din proteinele structurale au fost identificate prin analiză mutațională și tehnici de legare a ADN centromeric, motiv pentru care funcțiile și interacțiile proteinelor centromerice de la *S.cerevisiae* sunt cel mai bine caracterizate.

Până în prezent s-au identificat 12 proteine asociate situsului de 125 pb: Cbf1, Ndc10, Cep3, Ctf13, Skp1, Mif2, Cse4, Ctf19, Mcm21, Okp1, Slk19 și Mtw1. Cbf3 este complexul de legare la ADN al CDEIII centromeric și este compus din patru proteine: Ndc10, Cep1, Ctf13 și Skp1. Asamblarea complexului Cbf3-CDEIII necesită asocierea Skp1 cu Ctf13, care mediază activarea dependentă de fosforilare a Ctf13 (Fig. 11).

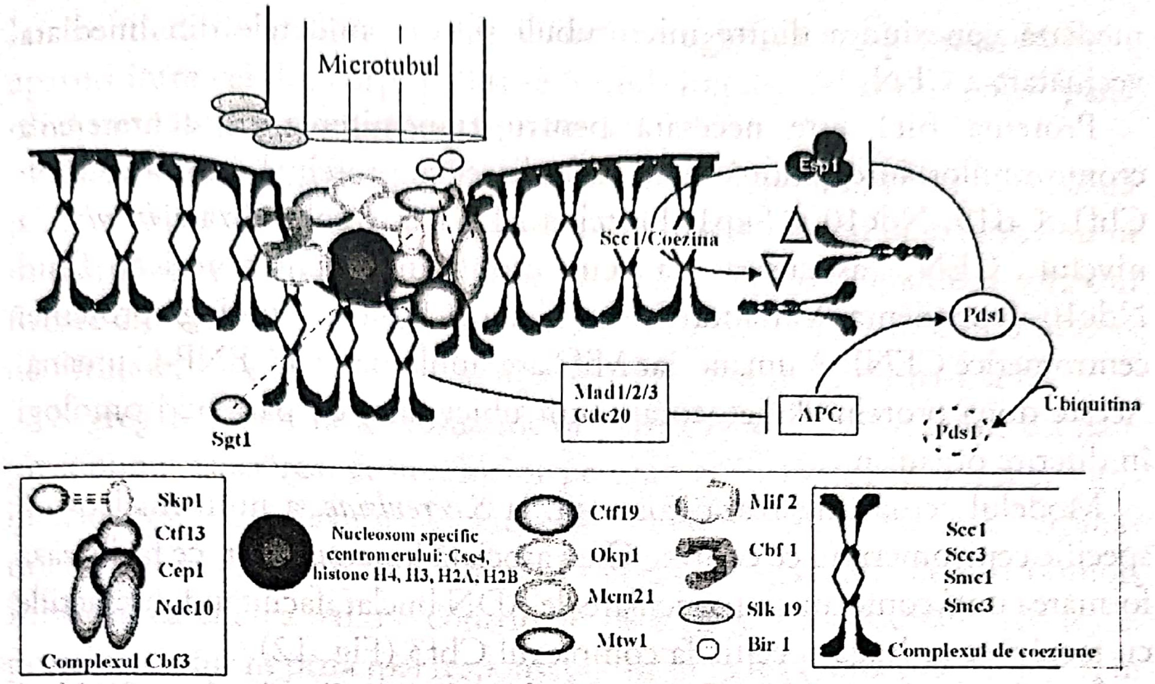

Microtubul
Esp1
Scc1/Coezina
Pds1
Mad1/2/3
Cdc20
APC
Ubiquitina
Pds1
Sgt1
Skp1
Ctf13
Cep1
Ndc10
Complexul Cbf3
Nucleosom specific centromerului: Cse4, histone H4, H3, H2A, H2B
Ctf19
Okp1
Mcm21
Mtw1
Mif 2
Cbf 1
Slk 19
Bir 1
Scc1
Scc3
Smc1
Smc3
Complexul de coeziune

Fig. 11 — Reprezentarea schematică a proteinelor asociate centromerului la ***S.cerevisiae.*** Activarea Ctf13 prin intermediul Skp1-Sgt1 conduce la asamblarea complexului Cbf3 care leagă CDEIII. Un nucleosom specific centromerului, ce conține Cse4, oferă o interfață proteinică ce mediază buclarea ADN centromeric, stabilizat prin interacțiile dintre componentele subcomplexului Ctf19-Okp1-Mcm21 și componentele Cbf3. Pe lângă Cbf1, Cse4 și Mif2 interacționeaza cu Ctf19 și Cbf3. Componentele punctului de control Mad1, Mad2, Mad3 și Bub3 monitorizează asamblarea kinetocorilor și blochează tranziția Metafaza-Anafaza, ca răspuns la defectele CEN sau la deteriorarea fusului de diviziune, prin inhibarea APC. Activarea APC determină degradarea securinei (Pds1) pe calea ubiquitinei (ub), cu eliberarea proteazei separin dependentă ce produce dublul clivaj al coezinei Scc1 și eliberarea coeziunii cromatidelor-surori, concomitent cu desfășurarea Anafazei (după Pidoux și Allshire, 2000).

Asocierea Ctf13 defosforilat-Skp1 cu dimerul Cep1 protejează Ctf13 de degradarea ubiquitin-dependentă. Acest complex Skp1-Ctf13-Cep1 interacționeaza cu Ncd10, complexul rezultat legându-se la ADN din CDEIII. Proteina Sgt1 se asociază și cu Skp1 și este necesară reglării activității Cbf3, prin activarea Ctf13. Cbf3 se leagă asimetric în dreapta CDEIII, legare ce induce unele răsuciri ale ADN și curbarea ADN la situsul de legare.

Proteinele Ctf19, Mcm21 și Okp1 sunt factori adiționali ce interacționează cu ADN centromeric, formează un subcomplex ce mediază conexiunea dintre microtubuli și componentele din imediata vecinătate a CEN.

Proteina Bir1 este necesară pentru transmiterea cu acuratețe a cromozomilor, interacționând direct/indirect cu proteinele asociate CEN: Cbf1, Ctf19, Ndc10 și Skp1. Proteina Mtw1 este colocalizată *in vivo* la nivelul CEN, asocierea sa cu cromatina centromerică fiind Ndc10-dependentă. Varianta Cse4 a histonei H3 este omologă proteinei centromerice CENP-A umane, iar Mif2 are similarități cu CENP-C umană. Aceste două proteine kinetocorale sunt ubicvitare, cu parteneri omologi în diferite organisme.

Modelul actual sugerează existența, la *S.cerevisiae*, a unui nucleosom specific centromerului ce conține Cse4 asociată kinetocorilor, ce facilitează formarea unei conformații particulare de ADN buclat, facilitând interacțiile cu factori ce se leagă specific la complexul Cbf3 (Fig. 12).

În celulele de drojdie aflate în Profaza diviziunii mitotice, ADN-ul centromeric este legat la complexul de proteine Cbf ce recunoaște regiunea III a secvenței CEN. Acest complex proteinic cu rol de factor de legare la centromer (CBF- _C_*entromer*-_B_*inding factor*) se leagă simultan la CEN și la unul din microtubulii ce emerg de la nivelul SPB. SPB este analogul funcțional al centriolului din celulele animale, fiind inclavat în anvelopa nucleară care rămâne intactă în cursul mitozei, spre deosebire de eucariotele superioare, unde nucleul se dezorganizează. SPB este replicat la începutul mitozei, fiecare din cele două structuri rezultate deplasându-se

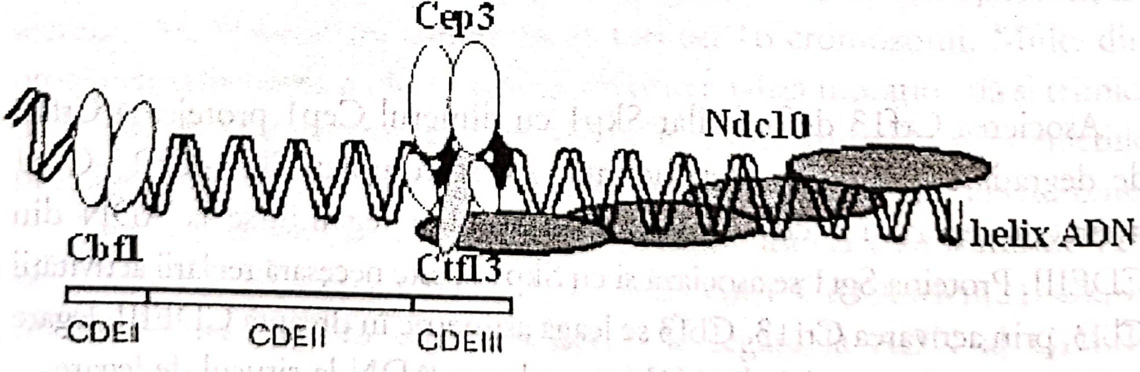


Fig. 12 — Componentele complexului Cbf3 și maniera de legare a acestora la secvențele centromerice de la ***S.cerevisiae*** (după Dobie și colab. 1999).

la câte unul din polii nucleului. Când înmugurirea începe, microtubulii apăruți între cei doi corpi polari se întind, impingând corpii polari până când unul dintre aceștia intră în mugure.

Factorii Cbf acționează ca "*motoare moleculare*", utilizând energia eliberată prin hidroliza ATP pentru a deplasa un centromer atașat de-a lungul unui microtubul, în direcția corpului polar. În acest fel, o cromatidăa-soră din fiecare cromozom metafazic migrează până la SPB din celula-fiică în curs de formare, iar cealaltă până la nivelul SPB prezent în celula-mamă.

Segregarea corectă a cromatidelor-surori în cursul diviziunii celulare presupune asocierea cromatidelor-perechi la fusul de diviziune, prin intermediul complexului kinetocoral atașat CEN. Coeziunea cromatidelor-surori joacă un rol important în reglarea segregarii cromozomilor. Întrucât catenarea ADN contribuie la legarea cromatidelor replicate, proteinele sunt în principal responsabile de atașarea cromatidelor-surori în cursul ciclului celular. Mare parte dintre studiile recente privind elucidarea factorilor implicați în stabilirea, menținerea și eliberarea coeziunii dintre cromatidele-perechi s-au efectuat pe *S.cerevisiae*. La această drojdie, s-a imaginat un model elegant pentru stabilirea și distrugerea coeziunii în cursul ciclului celular. Deoarece multe proteine cu omologie funcțională sunt folosite de către toate eucariotele în cursul ciclului celular, este clar faptul că această coeziune dintre cromatide-surori este un mecanism înalt conservat evolutiv. Totuși, există și diferențe importante în coeziunea la nivelul regiunilor centromerice, raportat la brațele cromozomului, între mitoză și meioză și între diferite specii.

În Anafaza mitozei, cromatidele-surori pierd complet coeziunea și se separă la cei doi poli opuși ai celulei în curs de diviziune. În contrast, în meioză, cromozomii pierd coeziunea într-un proces secvențial desfășurat în Anafaza I și Anafaza II. În cursul primei faze a diviziunii meiotice, cromatidele-surori pierd coeziunea de-a lungul brațelor cromozomale, dar rămân asociate la nivelul CEN astfel că ele se deplasează impreună la același pol (diviziunea reducțională). În Anafaza II, coeziunea la nivelul CEN se pierde, cromatidele-surori separându-se complet și deplasându-se către poli opuși (diviziunea ecvațională). La drojdii, complexul de coeziune este folosit atât în mitoză cât și în meioză, cu deosebirea că în cele două diviziuni sunt implicate subunități de coeziune diferite.

13. TELOMERE (TEL)

Telomerele (TEL) sunt complexe nucleoproteinice specializate, prezente la capetele cromozomilor lineari de la eucariote. TEL îndeplinesc trei funcții: (1) protejarea capetelor cromozomilor impotriva degradării și a fuziunii capăt-la-capăt (*end-to-end*), care crează cromozomi dicentrici a căror segregare greșită ar conduce la aneuploidie, (2) replicarea completă a cromozomilor, prin acțiunea telomerazei, și (3) poziționarea cromozomilor în interiorul nucleului. Rolul TEL în arhitectura nucleară este pronunțat în mod deosebit în meioză, când TEL se grupează pentru a crea un aranjament în ,buchet' a cromozomilor.

Date recente arată că TEL sunt structuri dinamice ale căror roluri se schimbă în cursul ciclului celular și o dată cu schimbările condițiilor de mediu. TEL participă și la organizarea funcțională a nucleului. La drojdii, complexul telomeric constituie un domeniu de cromatină represată, ce conferă un efect de poziție a telomerei (TPE - *telomere position effect*) asupra transcrierii genelor învecinate.

Fundamentală pentru funcționarea TEL, la aproape toate speciile, este secvența ADN-ului telomeric ce conține în mod obișnuit secvențe terminale dublu-catenare, bogate în TG, repetate tandemic, capatul 3' al catenei 5'→3' terminându-se cu o prelungire monocatenară de 12-16 nucleotide, dincolo de capatul 5' al catenei complementare.

Componentele proteinice se leagă la repetițiile ADN telomerice și interacționează cu proteine adiționale formând complexe multi-subunitare, cu rol de ,bonetare' (*capping*) a cromozomilor, esențial pentru menținerea stabilității genomice (Tabel 2. și Fig.13.).

În plus, TEL recrutează și reglează activitatea telomerazei – enzima ribonucleoproteinică ce previne epuizarea cromozomilor ce ar putea rezulta prin replicarea convențională a unei molecule ADN lineare: replicarea ADN de pe catena *leading* (5'→3') nu poate duplica prelungirea 3' monocatenară, întrucât catena complemetară bogată în C este mai scurtă și nu poate funcționa ca matriță, iar replicarea catenei *lagging* (3'→5') nu poate duplica cromozomii cu capete netede ce ar rezulta din pierderea prelungirii 3', deoarece îndepărtarea ARN *primer* de la fragmentul Okazaki terminal ar da naștere unui *gap* 5'- terminal. Telomeraza evită aceste probleme prin

Tabel 2. Componentele proteinice ale telomerelor de la drojdii (după Cooper L., 2000).

Factor	Funcție
Proteina RAP1	Leagă ADN telomeric, recrutează alți factori, reglează lungimea TEL și TPE. Prezintă o oarecare omologie funcțională și un domeniu de legare la ADN ca și factorul TRF1 uman.
Proteinele SIR2-4	Factori de silențiere a TEL și locusului MAT; interacționează cu histonele. Sir2 este implicată și în silențierea ADNr și are funcție nucleară. Sir2 este o ADP-ribozilază și deacetilază.
Proteina Rif1/2	Leagă RAP1. Este componentă a mecanismului de reglare a lungimii TEL.
Proteina Ku	Leagă capetele ADN. Reglează localizarea TEL la periferia nucleului, lungimea și structura TEL și TPE
Cdc13	Se leagă la prelungirea 3' monocatenară bogată în G. Mediază accesul telomerazei la TEL, previne degradarea catenei bogate în C.
Est1	Se leagă la prelungirea 3' monocatenară. Mediază accesul telomerazei la TEL.
Est2	Subunitatea catalitică cu rol de revers transcriptază a telomerazei
Tlc1	ARN structural/matriță a telomerazei.
ADN polα/δ	Polimerazele necesare replicării convenționale a ADN de pe catena *lagging*. Sunt necesare sintezei TEL de către telomerază.

utilizarea propriei subunități ARN interne ca matriță, pentru adăugarea repetițiilor telomerice la capetele cromozomilor.

14. RECRUTAREA TELOMERAZEI

La drojdii, cel puțin 5 proteine sunt necesare pentru activitatea *in vivo* a telomerazei: Est1-3 (*Ever shorter telomeres*), Tlc1 (*Telomere complement*) și Cdc13. Est 2 și Tlc1 sunt subunitățile cu rol de revers-transcriptază și

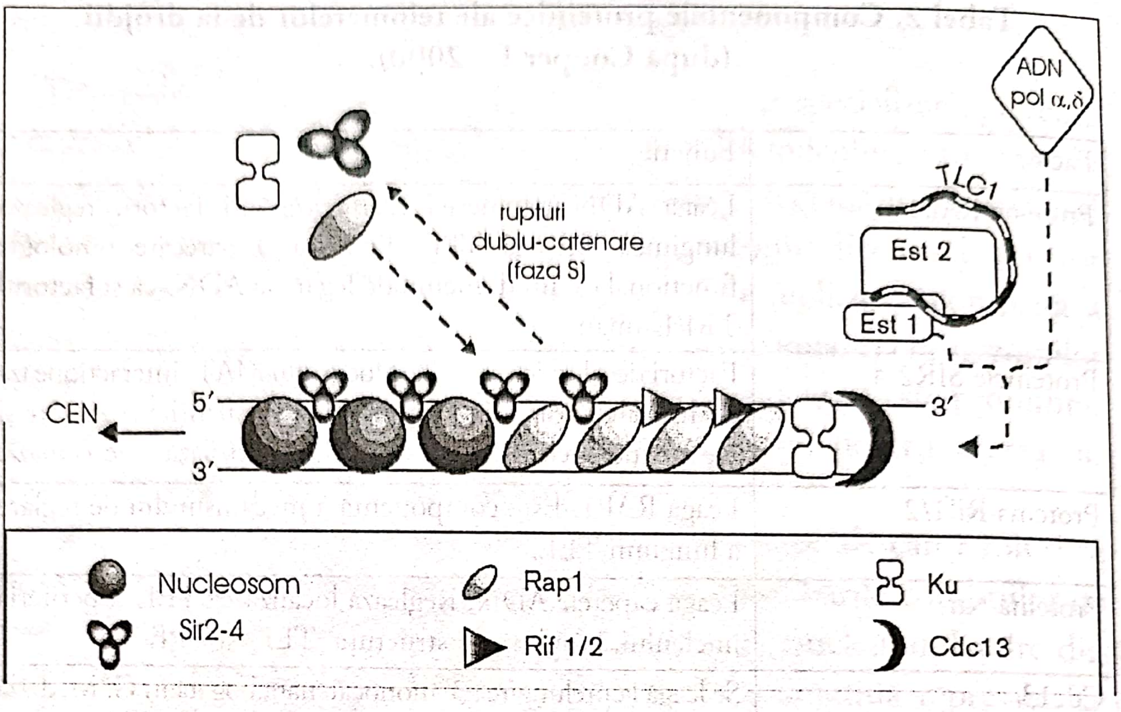


Fig. 13 — Componentele TEL de la drojdii. Factori adiționali, precum proteinele punctelor de control al lezarii ADN și nucleazele, afectează funcția TEL și interacționează temporar sau permanent cu complexul telomeric (după Cooper, 2000)

respectiv ARN matriță, componente necesare activității *in vitro* a telomerazei. Est1, Est3 și Cdc13 sunt modulatori ai telomerazei, iar Est1 și Est3 sunt asociate stabil la enzimă.

Dintre aceste proteine, proteina Cdc13 este factorul cheie al recrutării telomerazei, ce recunoaște o prelungire monocatenară bogată în T-G, de minimum 11 nucleotide. Dintre proteinele Est, Cdc13 se leagă la Est1 cu rol de punte între Cdc123 și telomerază, facilitând recrutarea telomerazei la capetele cromozomale.

Telomeraza este activă pe tot parcursul ciclului celular, însă elongarea TEL este restrânsă doar la nivelul fazei **S** târzii, fapt ce sugerează că elongarea TEL este dependentă de mașinăria de replicare. Într-adevar, pe lângă telomerază, proteina Cdc13 recrutează și complexul ADN polα-primaza (cu rol de reglator negativ al activității telomerazei) pentru replicarea TEL. Asocierea Cdc13 cu subunitatea catalitică a ADN polα-primaza ca și cu ADN polδ/Cdc2 este esențială pentru sinteza *de novo* a TEL (Fig. 14).

Ipoteza conform căreia complexul ADN polα-primaza joacă un rol critic în replicarea TEL este susținută de prezența într-o formă hiperfosforilată a proteinei de replicare A (RPA – *Replication Protein A*), proteină ce se leagă la ADNmonocatenar (ADNmc) și interacționează specific cu subunitatea mare a ADN polα.

Reglajul pozitiv al recrutării telomerazei Cdc13 dependentă este asigurat de heterodimerul Ku70-Ku80, contactul direct dintre acesta și subunitatea ARN a telomerazei stabilizând interacția Cdc13-telomerază.

15. REGLAREA LUNGIMII TEL

O dată localizată la capătul cromozomal, activitatea telomerazei trebuie reglată pentru a evita adiția nelimitată de repetiții TG (Fig. 14.). Astfel, pe lângă controlul asigurat prin reglarea interacției Cdc13-Est1, repetițiile telomerice sunt supravegheate de către un mecanism de detectare a lungimii, bazat pe legarea unei proteine RAP1 *per* 15-18 bp din repetiția TG. Domeniul carboxi-terminal al RAP1 este, la rândul său, legat de doi heterodimeri diferiți ce se completează reciproc: complexul Rif1-Rif2 (factor de interacțiune cu Rap1C - *RAP1 interacting factor*) și Sir3-Sir4. Supravegherea ține cont de numărul de proteine Rif legate la RAP1, proteinele Rif fiind cele ce pot represa telomeraza prin inhibarea acțiunii kinazei Tel1. În calea Tel1 de control a telomerazei participă și complexul MRX (Mre1, Rad50, Xrs2) – complex multifuncțional, cu rol de helicază/endonuclează.

La drojii, observații recente sugerează că TEL funcționează între două stări, în care structura sa este “accesibilă” sau “inaccesibilă” acțiunii telomerazei sau altor enzime. Această funcționare între o stare “deschisă” și o stare “închisă” este influențată de semnale precum kinazele activate de punctele de control celular, evenimentele ciclului celular și procesele de diferențiere celulară. În starea ‚deschisă', un TEL poate mima un capăt ADN liber care va solicita acțiunea enzimelor de ‚bonetare' (Fig. 15.). În această stare, pot avea loc și evenimente nedorite precum fuziunile capăt-la-capăt sau degradarea excesivă. Dacă acțiunea telomerazei nu poate reface structura originală a TEL, atunci acest TEL deschis este recunoscut ca o ruptură ADN dublucatenară ireparabilă, ce va provoca moartea apoptotică sau blocarea ciclului celular.

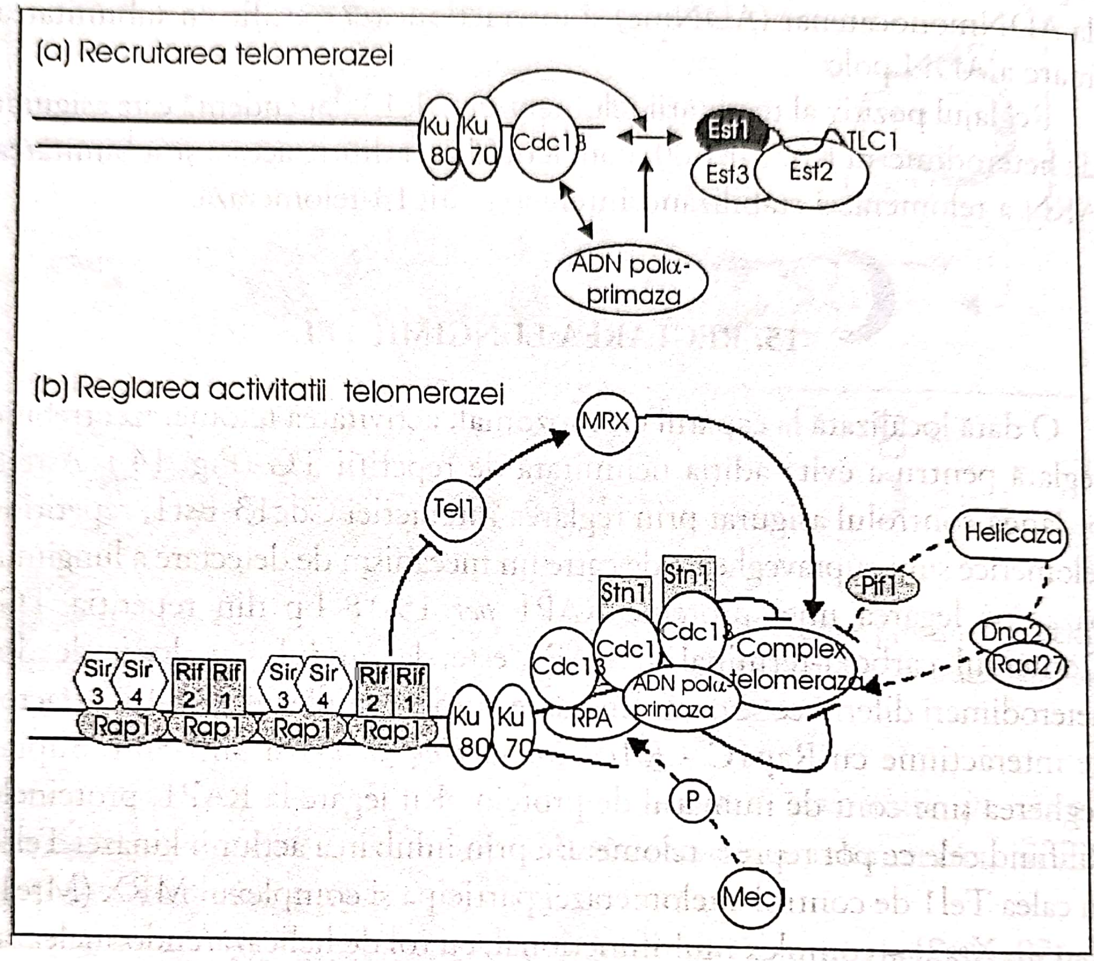

(a) Recrutarea telomerazei
Ku 80
Ku 70
Cdc13
Est1
TLC1
Est3
Est2
ADN polα-primaza
(b) Reglarea activitatii telomerazei
MRX
Tel1
Helicaza
Pif1
Stn1
Stn1
Cdc13
Cdc13
Cdc13
Complex telomeraza
Dna2
Rad27
Sir 3
Sir 4
Rif 2
Rif 1
Rap1
Rap1
Sir 3
Sir 4
Rif 2
Rif 1
Rap1
Rap1
Ku 80
Ku 70
RPA
ADN polα primaza
P
Mec

Fig.14 — Recrutarea și reglarea activității telomerazei la ***S.cerevisiae.*** (a) Cdc13 este factorul cheie de recrutare a telomerazei. Cdc13 se leagă la Est1, această interacție fiind reglată pozitiv de heterodimerul Ku70-Ku80 și de către complexul ADN polα-primaza. Est1 interacționeaza direct cu Tlc1, în absența Est2 și Est3, legarea ultimelor două proteine la Tlc1 fiind dependentă de Est1. (b) O dată ce telomeraza și ADN polα-primaza au fost recrutate, complexul ADN polα-primaza reglează negativ activitatea telomerazei pentru a evita sinteza asincronă a celor două catene ADN telomerice. În plus, elongarea catenei bogate în TG, dependentă de telomeraza, este inhibată de interacția dintre Cdc13 și Stn1. Proteina Tel1 interacționează cu complexul MRX pentru a activa telomeraza reglată negativ de heterodimerul Rif1-Rif2, legat la RAP1C. De asemenea, helicazele afectează reglajul lungimii TEL.. În mod special, helicaza Pif1 inhibă telomeraza, în vreme ce helicaza Dna2 conlucrează cu nucleaza Rad27, la procesarea fragmentelor Okazaki (după Dubrana și colab., 2001).

16. EFECTUL DE POZIȚIE A TELOMEREI - TPE
(TELOMERE POSITION EFFECT)

Genele inserate în regiunile subtelomerice ale cromozomilor de drojdii sunt silențiate transcripțional, această silențiere fiind cunoscută ca *silențiere telomerică* sau *efect de poziționare a telomerei*. În fenomenul de silențiere telomerică sunt implicate proteinele RAP1 și Sir2-4, nucleosomii cu cozile amino-terminale ale histonelor neacetilate și heterodimerul Ku70-Ku80. Copiile multiple ale RAP1 legate la repetițiile dublucatenare TG recrutează proteinele Sir3 și Sir4, complexul Sir legându-se la cozile histonelor. Ulterior, complexul Sir2-4 se propagă 2-3kpb de-a lungul nucleosomilor, în secvențele subtelomerice.

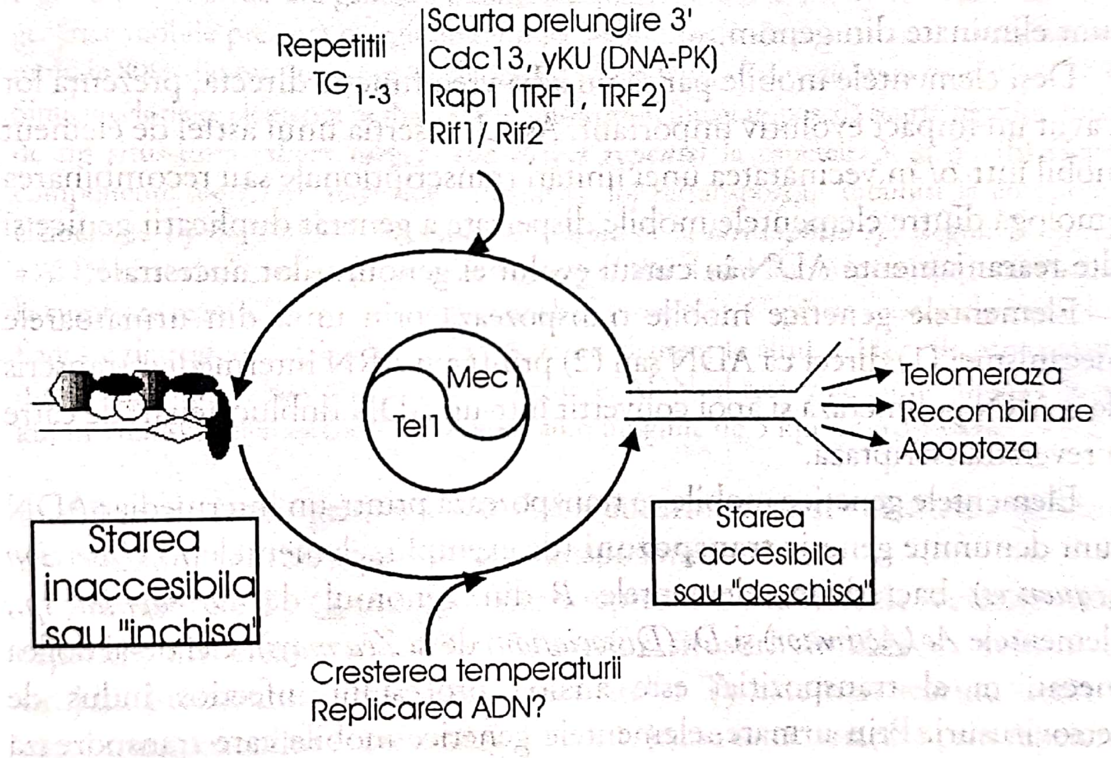

Repetitii TG$_{1-3}$
Scurta prelungire 3'
Cdc13, yKU (DNA-PK)
Rap1 (TRF1, TRF2)
Rif1/ Rif2
Mec1
Tel1
Telomeraza
Recombinare
Apoptoza
Starea inaccesibila sau "inchisa"
Starea accesibila sau "deschisa"
Cresterea temperaturii
Replicarea ADN?

Fig. 15 — Comutarea TEL între cele două stări: starea ‚deschisă' și starea ‚închisă'. Starea deschisă a TEL este accesibilă pentru recrutarea telomerazei și elongarea TEL sau pentru acțiunea mașinării de recombinare genetică. Comutarea între cele două stări este modulată prin acțiunea antagionistă a proteinelor Mec1 și Tel1 (după Dubrana și colab., 2001).

Gruparea TEL la periferia nucleului, ca și faptul că silențierea telomerică este extrem de sensibilă la concentrația proteinelor Sir, a condus la concluzia că, prin grupare, telomerele formează un rezervor de proteine de silențiere necesare represiei genelor subtelomerice.

17. ELEMENTE GENETICE MOBILE LA *S.CEREVISIAE*

Elementele genetice mobile sunt definite ca fiind paraziți moleculari care, aparent, nu au nici o funcție specifică în biologia organismului-gazdă, dar există doar pentru a se automenține, motiv pentru care astfel de elemente ADN mobile sunt cunoscute și ca "ADN egoist" (*selfish DNA*). La scară evolutivă, acumularea acestor elemente mobile s-a făcut încet, întrucât rata cu care acestea transpozează la noi situsuri este balansată de rata cu care sunt eliminate din genom.

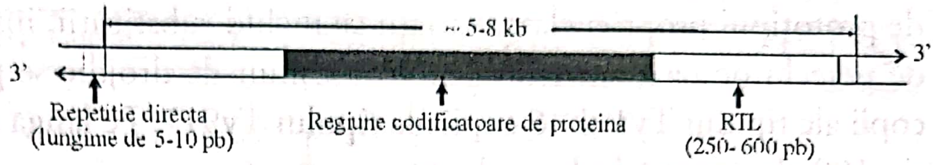
Deși elementele mobile par să nu aibă vreo funcție directă, prezența lor a avut un impact evolutiv important. Astfel, inserția unui astfel de element mobil într-o/ în vecinătatea unei unități transcripționale sau recombinarea omologă dintre elementele mobile dispersate a generat duplicații genice și alte rearanjamente ADN în cursul evoluției genomurilor ancestrale.

Elementele genetice mobile transpozează prin unul din următoarele mecanisme: (1) direct ca ADN sau (2) printr-un ARN intermediar transcris de o ARN polimerază și apoi convertit într-un ADN dublucatenar, de către o reverstranscriptază.

Elementele genetice mobile ce tranzpozează printr-un intermediar ADN sunt denumite generic **transpozoni** (de exemplu, elementele *IS* (*Insertion Sequences*) bacteriene, elementele *P* din genomul de *Drosophila sp.*, elementele *Ac* (*Activator*) și *Ds* (*Dissociation*) de la *Zea mays*). Cel de-al doilea mecanism al transpoziției este analog procesului infecțios indus de retrovirusuri. Prin urmare, elementele genetice mobile care transpozează la noul situs genomic prin intermediul unui ARN sunt denumite **retrotranspozoni** (de exemplu, elementele *Ty* (*Transposon yeast*) de la drojdii, elementele *Copia* de la *Drosophila sp.*, retrotranspozonii nevirali *Lines* și *Sines* de la mamifere) (Fig. 16).

Elementele genetice transpozabile sunt entități genetice cu structuri definite ce se pot integra în diverse zone ale aceluiași genom sau se pot

(a) Retrotranspozoni virali



(b) Gene in ADN retroviral si retrotranspozoni virali

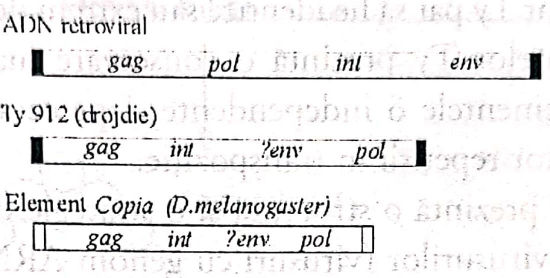


Fig. 16 (a) — Structura generală a retrotranspozonilor de la eucariote. Aceste elemente genetice mobile prezintă o regiune centrală codificatoare de proteină, ce reprezintă mai mult de 80% din retrotranspozon, flancată de două repetiții directe lungi terminale (LTR). Similar celorlalte elemente mobile, retrotranspozonii integrați posedă scurte repetiții directe de tip situs-țintă (***short target- site direct repeats***) la capetele 3' și 5'. (b) Genele componente ale ADN retroviral integrat și doi retranspozoni întâlniți la eucariote – elementele Ty de la drojdii și elementele ***Copia*** de la ***Drosophila sp.*** Regiunea centrală a ADN retroviral conține patru gene – ***gag, pol, int*** și ***env***. În retrotranspozonii virali de la eucariote regiunile centrale codifică analogi proteinici. Capetele acestor elemente sunt flancate de regiuni LTR. Deși diferă de la un element la altul, LTR-urile sunt repetiții directe ce conțin 250-600 pb în toate cazurile. ADN-ul retroviral are o lungime de 5-7 kb, în vreme ce elementele Ty și C***opia*** au o lungime de 5 kpb (după Lewin, 1997).

mobiliza de la un genom la altul. La eucariote, aceste elemente genetice mobile sunt reprezentate de retrotanspozoni.

Elementele Ty (*T̲ransposon yeast*) reprezintă o familie de secvențe ADN repetitiv dispersate la nivelul diferitelor situsuri, în diferite tulpini de drojdii. Frecvența transpoziției elementelor Ty este mai scăzută decât în cazul transpozonilor bacterieni ($\sim 10^{-7}$-10^{-8}) și se caracterizează prin repetarea unei secvențe de 5pb a ADN-țintă, fiecare secvență flancând elementul Ty inserat.

Pe baza diferențelor existe între diverse elemente Ty, acestea se împart în două clase majore denumite Ty1 și Ty917. Cu toate acestea, ambele clase de transpozoni prezintă aceeași organizare generală. Fiecare element are o lungime de 6.3kpb: ultimele 330 pb de la fiecare capăt constituie așa-numitele *repetitii directe* δ. Membrii fiecărei clase prezintă variații față de prototipul propriei clase, variații ce includ substituții, inserții și deleții de perechi de baze. Într-un genom obișnuit de drojdie se găsesc ~30 de copii ale tipului Ty1 și ~6 copii ale tipului Ty917. Pe lângă acestea, există și ~100 elemente δ independente.

Secvențele δ sunt extrem de heterogene, chiar dacă cele două repetiții ale aceluiași element Ty par să fie identice sau extrem de înrudite. Secvențele δ asociate elementelor Ty prezintă o conservare mai înaltă a secvenței comparativ cu elementele δ independente, fapt ce sugerează implicarea recunoașterii acestor repetiții în transpoziție.

Elementele Ty prezintă o structură și o strategie de exprimare asemănătoare cu a retrovirusurilor (virusuri cu genom ARN monocatenar). La acestea, genomul ARN sub acțiunea reverstranscriptazei este convertit într-un ADN inițial monocatenar și ulterior într-un ADN dublucatenar.

Pe lângă gena *pol* codificatoare a reverstranscriptazei, genomul retroviral conține și alte trei gene codificatoare de proteine: gena *gag* ce codifică o proteină precursor procesată prin clivaj proteolitic într-o proteină virală internă, gena *env* ce codifică un precursor proteic procesat la proteine ale invelișului viral și gena *int* ce codifică enzima integrază.

Elementul Ty este transcris în două specii de ARN poliadenilate ce reprezintă mai mult de 5% din transcriptomul (totalul moleculelor ARNm) existente într-o celulă haploidă de drojdie. În ambele cazuri, transcrierea este inițiată dintr-un promotor unic plasat la nivelul elementului δ stâng. Transcrierea primului transcript ARNm ia sfârșit după 5.0 kb, celălalt transcript terminându-se după 5.7kp, în interiorul elementului δ drept (Fig. 17).

Secvența elementului Ty prezintă două ORF-uri (TyA și TyB) exprimate în aceeași direcție, dar citite în diferite faze, suprapuse prin 13 aminoacizi. TyA codifică o proteină de legare la ADN, iar proteina TyB prezintă regiuni de omologie de secvență cu reverstranscriptaza, proteaza și integraza retrovirusurilor.

Elementele Ty posedă regiuni de omologie ce reprezintă ținte în procesele de recombinare mediate de sistemele gazdei. În mod obișnuit, la nivel cromozomal, un astfel de eveniment se finalizează cu o deleție sau inversie, prin recombinarea dintre două elemente Ty pe un cromozom sau cu

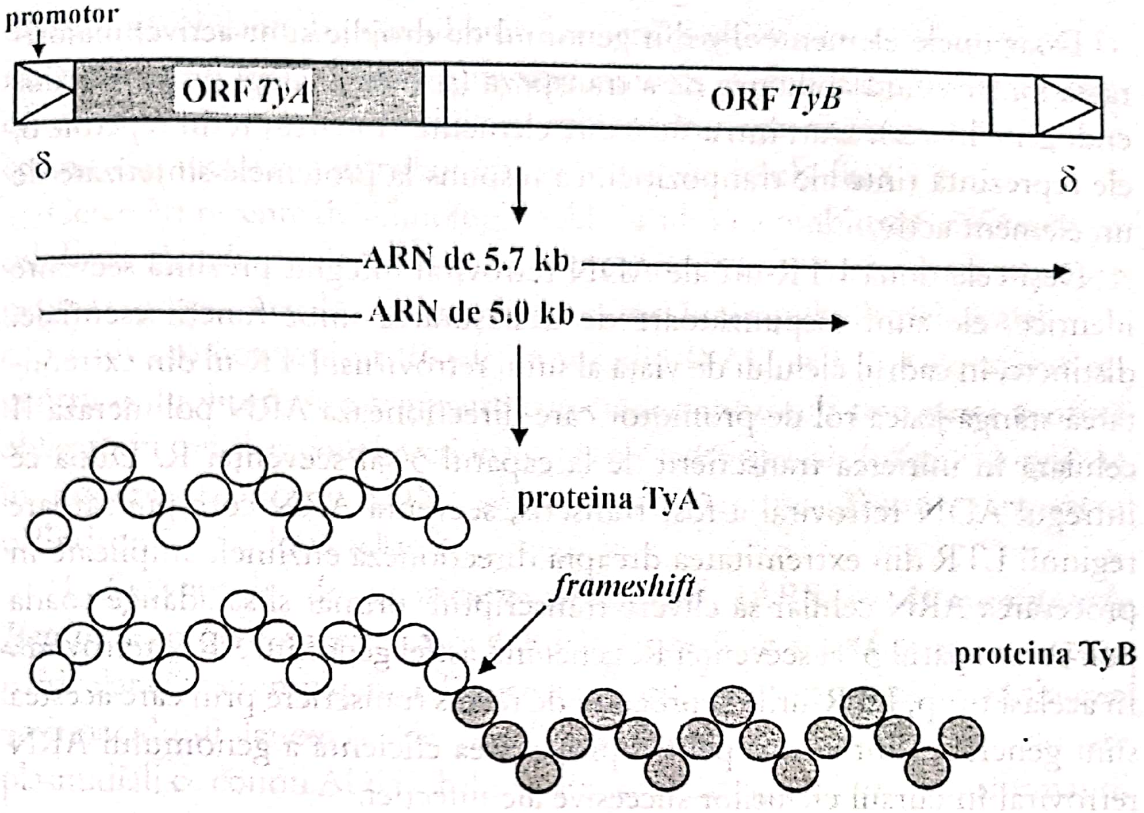


Fig.17 — Elementele Ty de la drojdii prezintă la extremități repetiții directe scurte și sunt transcrise în două molecule ARN suprapuse. Prezintă două cadre de citire (ORF) cu secvențe înrudite cu a genelor retrovirale ***gag*** și ***pol*** (după Lewin, 1997).

modificări mult mai severe, atunci când recombinarea are loc între două elemente plasate pe cromozomi diferiți.

Similar retrovirusurilor, elemetele Ty sunt retropozoni clasici, transcriși într-un intermediar ARN recunoscut de aparatul de *splicing* celular și, ulterior, de o reverstranscriptază cu ajutorul căreia se va regenera o copie ADN.

Deși elementele Ty nu dau naștere la particule infecțioase, acumularea de particule *virus-like* (VLP – *Virus Like Particles*) are loc în celule în care s-a indus transpoziția. Astfel de particule conțin ADN d.c., ARN, reverstranscriptaza și produși TyB cu rol de integrază. Produsul TyA este clivat ca un precursor *gag*, în vederea producerii proteinelor interne virale, mature, ale VLP-lor. Aceste analogii cu retrovirusurile sugerează faptul că elementele Ty se comportă ca un retrovirus ce și-a pierdut genele *env*, fiind incapabil să-și împacheteze genomul.

Doar unele elemente Ty din genomul de drojdie sunt active, majoritatea lor pierzând abilitatea de a transpoza (și sunt analogi provirusurilor endogene inerte). Dar, întrucât aceste elemente "moarte" rețin repețiile δ, ele reprezintă ținte ale tranpoziției, ca răspuns la proteinele sintetizate de un element activ.

Deși cele două LTR-uri ale ADN retroviral integrat prezintă secvențe identice, ele sunt răspunzătoare de desfășurarea unor funcții esențiale, distincte, în cadrul ciclului de viață al unui retrovirus. LTR-ul din extremitatea stângă joacă rol de promotor care direcționează ARN polimeraza II celulară în inițierea transcrierii de la capatul 5' al secvenței R. După ce întregul ADN retroviral a fost transcris, secvența ARN corespunzătoare regiunii LTR din extremitatea dreaptă direcționeză enzimele implicate în procesarea ARN celular să cliveze transcriptul primar și să adauge coada poli-A la capătul 3' al secvenței R, generând astfel genomul ARN retroviral. În același timp, LTR-urile și procesul de revers transcriere prin care acestea sunt generate sunt critice pentru propagarea eficientă a genomului ARN retroviral în cursul ciclurilor succesive ale infecției.

Reverstranscrierea generează o secvență de ADN cu capete LTR care direcționează sinteza și procesarea ARN viral cu secvențe terminale precise, care permit o rundă ulterioară a reverstranscrierii. Prezența LTR-urilor în structura elementelor Ty sugerează faptul că acestea transpozează într-o manieră similară reverstranscrierii ARN-ului retroviral.

Elementele Ty conțin regiuni codificatoare pentru proteine omologe cu cele retrovirale. Mai mult, elementele Ty generează repetiții directe scurte la situsul de inserție, caracteristică prezentă și la celelalte elemente genetice mobile.

18. YAC-URI *(YEAST ARTIFICIAL CHROMOSOMES)* – CROMOZOMI ARTIFICIALI DE DROJDII

Cromozomul eucariot este o structură lineară, alcătuită dintr-o singură moleculă ADN ce există în formă condensată sau relaxată, asociată cu histone, proteine de tip *esafod* ('*scaffold*') și alte proteine mai puțin abundente. Deși cromozomii diferă ca lungime și număr la diferite specii, studiile citogenetice au relevat comportamentul similar al acestora în cursul diviziunii celulare. În cursul mitozei, cromatidele-surori se atașează la microtubulii fusului de diviziune și se aliniază în placa metafazică, pentru ca ulterior să se separe la nivelul centromerelor, câte o cromatidă din fiecare cromozom metafazic distribuindu-se în fiecare celulă-fiică.

Cercetări recente de tehnologie a ADN-ului recombinant, efectuate pe celule de drojdie, au identificat toate elementele cromozomale necesare pentru segregarea egală a cromatidelor-surori în timpul mitozei. Astfel, s-au construit cromozomii artificiali de drojdie (YAC-uri). S-a constatat că, pentru o duplicare și o segregare corectă, cromozomii trebuie să conțină obligatoriu trei elemente funcționale: (1) secvențe speciale (origini) implicate în inițierea replicării ADN, (2) o centromeră și (3) un aranjament palindromic de două telomere.

(1) Secvențele de replicare autonomă (ARS – *Autonomously Replicating Sequences*). Dacă celulele de drojdie sunt lipsite de o genă particulară (de exemplu, una din genele ce codifică o enzimă necesară sintezei aminoacidului leucină), ele pot fi transformate cu vectori de clonare plasmidiali ce conțin ADN-ul absent (în acest caz, gena *leu*). Transformanții Leu$^+$, care pot crește pe medii lipsite de leucină, sunt obținuți mult mai frecvent dacă plasmidele conțin o secvență ARS de aproximativ 100pb. Aceste secvențe acționează ca origini ale replicării, permițând plasmidului circular transformat să se replice la nivel nuclear, în celulele de drojdie.

(2) Centromere (CEN). În cazul celulelelor de drojdie defective în sinteza leucinei și transformate cu o plasmidă circulară simplă, ce conține numai gena *leu*/ARS, doar 5-20% din celulele progene conțin această plasmidă ca urmare a eșecului segregării mitotice a acesteia. Totuși, dacă fragmente de restricție din genomul ADN de drojdie sunt clonate în astfel de plasmide circulare, s-a observat că un număr mic din aceste fragmente conferă o segregare egală a plasmidelor atât în celula-mamă, cât și în celulele-fiice rezultate prin mitoză. Astfel de fragmente derivate din centromerele cromozomilor de drojdie sunt denumite secvențe CEN.

(3)Telomere (TEL). O plasmidă circulară, ce conține o secvență ARS și una CEN, supusă acțiunii unei enzime de restricție devine lineară. Astfel de plasmide lineare nu se replică în celulele de drojdie decât atunci când conțin secvențe telomerice speciale, legate la capetele lor.

Primele experimente de transfecție a celulelor de drojdie cu plasmide lineare au folosit capetele unei molecule ADN cu capacitatea de a se replica ca o moleculă lineară, în protozoarul *Tetrahymena sp.* În ciclul de viață de la *Tetrahymena sp.*, mare parte din ADN-ul nuclear este copiat repetat în fragmente mici care formează așa-numitul macronucleu. Unul din aceste fragmente repetate a fost identificat ca fiind un dimer al ADN ribozomal (ADNr) ale cărui capete conțin o secvență repetată $(G_4T_2)_n$. Atașarea unei secțiuni din această secvență TEL repetată la capetele plasmidelor lineare de drojdie, ce conțin ARS și CEN, permite replicarea și segregarea corectă a acestora.

Plasmidele circulare sau lineare identificate până în prezent la drojdii prezintă toate componentele de bază ale unui cromozom artificial de drojdie. Pentru construirea unui YAC, secvențele TEL (ce permit replicarea unei molecule ADN lineare, în totalitatea sa) de la drojdie sau de la *Tetrahymena sp.* sunt combinate cu secvențele CEN și ARS de drojdie. La acestea se adaugă gene de drojdie cu rol de markeri de selecție și suficient ADN din orice altă sursă pentru a se ajunge la un total de mai mult de 50kpb. Astfel de YAC-uri se replică și segregă aproape perfect în celulele de drojdie, cu doar o celulă-fiică din 1000-10000 care nu primește un cromozom artificial. În cursul meiozei, cele două cromatide-surori ale cromozomului artificial se separă corect, cu producere de spori haploizi (Fig. 18).

Din punct de vedere practic, YAC-urile pot fi folosite ca vectori de clonare pentru fragmente foarte lungi de cromozomi, provenite de la alte specii. Acești vectori de clonare, stabil propagați în celulele de drojdii, sunt extremi de utili în manipulările genetice, prin recombinare omologă la drojdii, permițând introducerea eficientă a mutațiilor, delețiilor, inserțiilor și substituțiilor de nucleotide în locații precize din interiorul YAC-urilor. Recombinarea omologă permite și îndepărtarea secvențelor ADN nedorite prezente în YAC-uri, adesea introduse în cursul producerii librăriilor de YAC (YAC-uri himere), ca și în cazul generării de YAC-uri lungi pornind de la un număr mare de YAC-uri scurte.

YAC-urile s-au dovedit a fi extrem de utile în cartarea genomurilor de la numeroase organisme, ca și în identificarea genelor responsabile de apariția unor maladii. De exemplu, YAC-urile au fost folosite extensiv la clonarea unor fragmente de ADN uman cu o lungime de până la 1000kp, permițând izolarea de clone YAC suprapuse care, colectiv, acopereau aproape întreaga lungime a cromozomilor umani individuali.

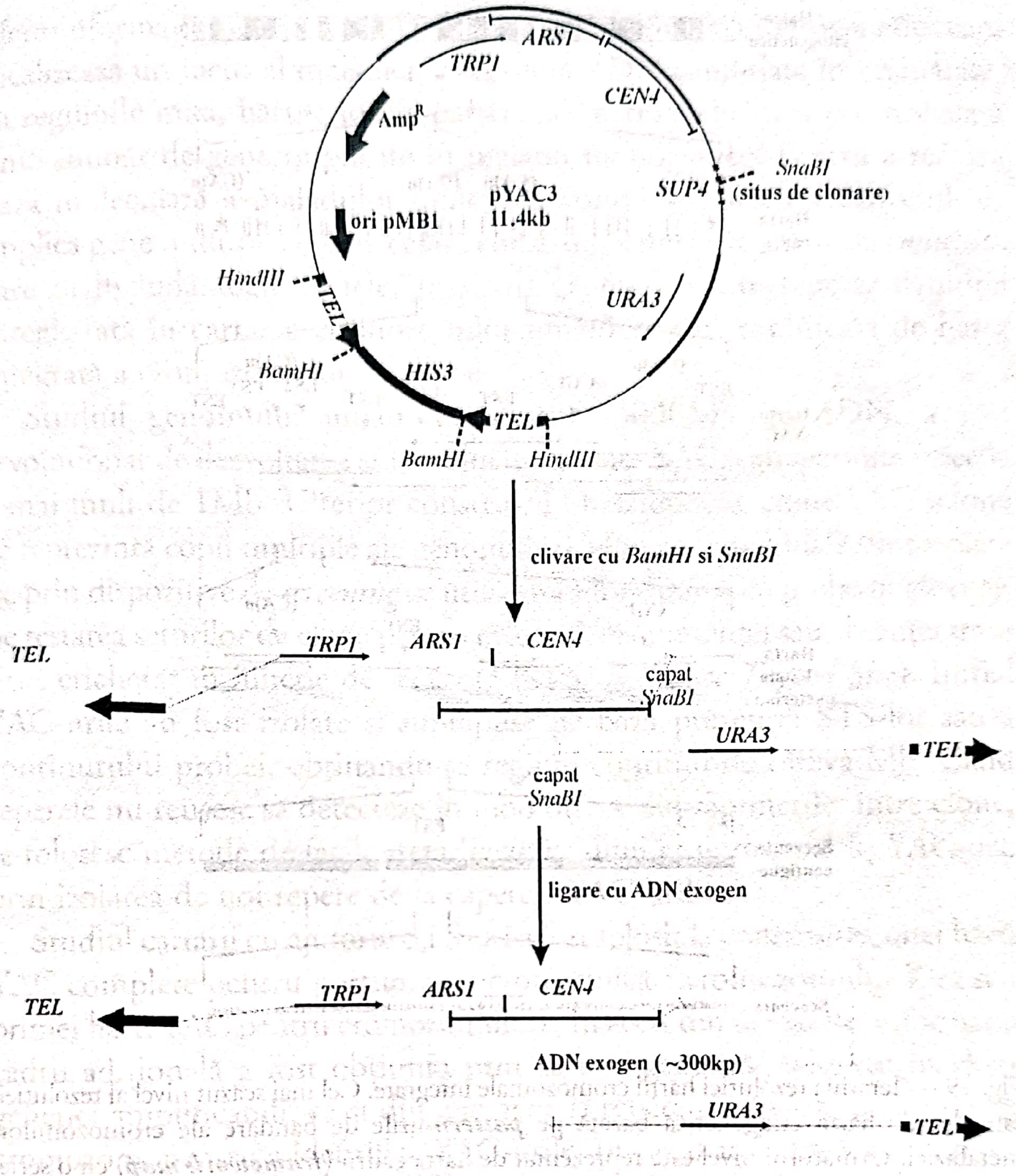

ARS1
TRP1
CEN4
Amp^R
SnaBI
SUP4 (situs de clonare)
pYAC3
11.4kb
ori pMB1
HindIII
TEL
URA3
BamHI
HIS3
TEL
BamHI
HindIII
clivare cu BamHI si SnaBI
TEL
TRP1
ARS1
CEN4
capat SnaBI
URA3
TEL
capat SnaBI
ligare cu ADN exogen
TEL
TRP1
ARS1
CEN4
ADN exogen (~300kp)
URA3
TEL

Fig. 18 — Un vector de clonare YAC conține toate elementele necesare propagării cromozomilor (ARS, CEN, TEL) în celulele de drojdii, un situs de clonare și markeri de selecție (de exemplu, gena ***ura3***) (după Lewin, 1997).

Înțelegerea determinismului genetic al structurii și funcției biologice la om necesită cunoașterea organizării secvențelor nucleotidice ale tuturor cromozomilor umani. Acest lucru presupune integrarea informațiilor privind harta cromozomală, oferite de nivelele crescute de rezoluție obținute prin combinarea diverselor tehnici (Fig. 19). Harta integrată a cromozomilor

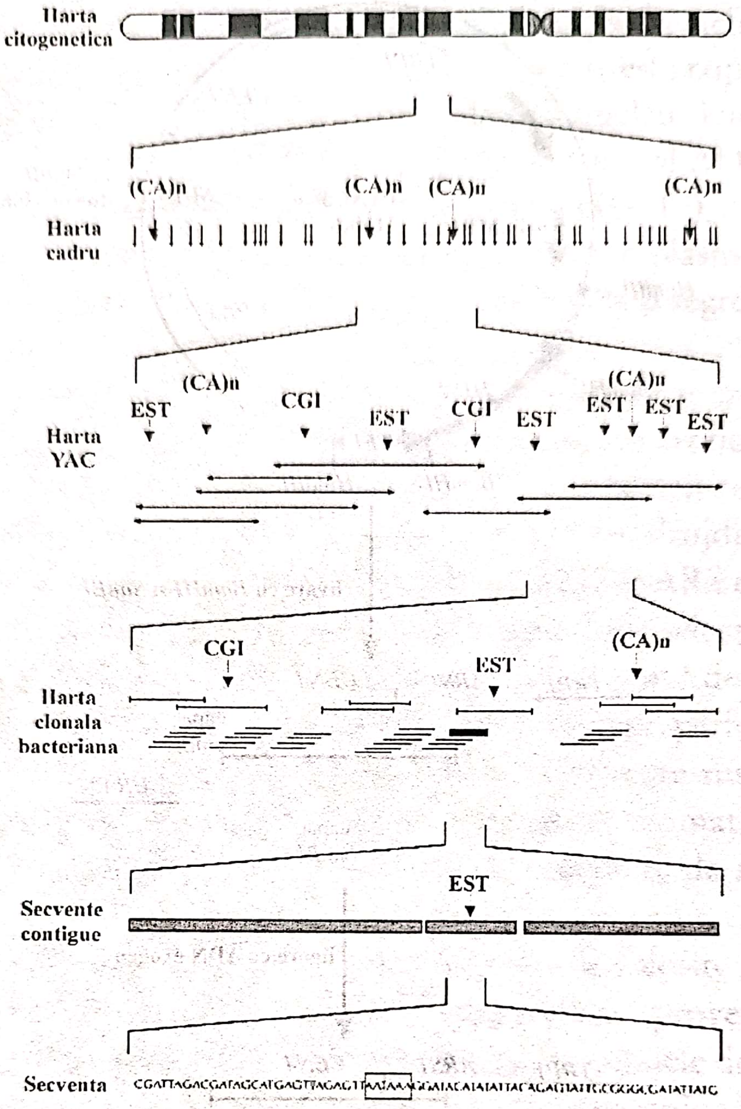

Harta citogenetica
(CA)n
(CA)n
(CA)n
(CA)n
Harta cadru
(CA)n
CGI
EST
EST
CGI
EST
(CA)n
EST
EST
EST
Harta YAC
CGI
EST
(CA)n
Harta clonala bacteriana
EST
Secvente contigue
Secventa
CGATTAGACGATAGCATGAGTTAGACTTAATAAAGGATACATATATTACAGAGTATTCCGGGCATATTATG

Fig. 19 — Ierarhia rezoluției hărții cromozomale integrate. Cel mai scăzut nivel al rezoluției este dat de harta citogenetică bazată pe ***pattern***-urile de bandare ale cromozomilor metafazici. Următorul nivel este reprezentat de harta cadru (***framework map***) cu o serie de markeri cum ar fi EST (***Expressed Sequence tag***), secvențelele de tip insulă CpG (CGI), repetiții microsatelit ([CA]n) sau markeri ADN anonimi. Densitatea de markeri estimată permite poziționarea unui marker ***per*** 100kb, cu markeri genetici distribuiți câte unul ***per*** cM. Harta cadru ancorează harta YAC printre markerii din nivelul următor de rezoluție. Markeri adiționali care nu pot fi rezolvați în harta cadru pot impinge densitatea reperului la 1 reper ***per*** 50kp. Harta YAC poate fi apoi folosită, în combinație cu ***fingerprinting***-ul, la asamblarea hărții clonale bacteriene, alcătuită cu cosmide și cromozomi artificiali bacterieni (BAC – ***Bacterial Artificial Chromosomes***). Această hartă este denumită « ***sequence-ready*** » și poate avea o rezoluție de 10kb. În sfârșit, clonele bacteriene pot fi folosite la determinarea secvenței ADN - harta fizică cu rezoluția cea mai mare (după Lamb și Gearhart, 1995).

oferă informația necesară relatării markerilor genetici și citogenetici care localizează un locus al maladiei la secvența ADN candidată în vecinătate. În regiunile mici, hărțile locale parțiale au permis clonarea pozițională a unui număr de gene implicate în maladii monogenice. Pentru a rezolva baza moleculară a maladiilor mult mai complexe, precum cancerul, ce implică gene multiple, este necesară construirea unei singure hărți *consensus* care să includă toate genele, markerii genetici și alte repere. Evoluția înregistrată în cartarea cromozomilor umani este exemplificată de harta integrată a cromozomului 22 uman.

Studiul genomului uman, ce conține 3000Mb de ADN, a fost revoluționat de dezvoltarea sistemului de clonare YAC, care permite inserția a mai mult de 1Mb. Ulterior construirii librăriilor de clone YAC (clone ce reprezintă copii multiple ale genomului), clonele individuale sunt izolate fie prin dispozitive de *screening* ce utilizează hibridizarea cu probe *single-copy*, fie testarea seturilor de clone pentru evidențierea prezenței sau absenței unui situs etichetat în funcție de secvență (STS- *Sequence Tagged Site*). Inițial YAC-urile au fost izolate și suprapuse pe baza prezenței STS-lor sau a conținutului probei, obținându-se regiuni continui de câteva Mb. Când reperele nu reușesc să detecteze în mod direct suprapunerile între clone, se folosesc metode de facilitare a '*walking*'-ului cromozomal în YAC-uri, prin izolarea de noi repere de la capetele YAC-urilor.

Studiul cartării cu ajutorul STS-uri a fost folosit la construirea unei hărți YAC complete pentru porțiunea eucromatinică a cromozomului Y ca și a primei hărți YAC pentru cromozomul 21. În acest din urmă caz, informația cadru adițională a fost obținută prin cartare genetică, folosind markeri genetici amplificabili, ca și din alte gene și repere cunoscute și cartate pe cromozom, pentru a identifica YAC-urile. În cazul ambelor hărți cromozomale densitatea aproximativă a reperelor a fost identică (1 la 22kpb), suficientă pentru a stabili continuitatea dintre YAC-urile suprapuse.

Cercetări recente au raportat introducerea YAC-urilor în linia celulară germinativă de la șoareci. Introducerea stabilă a unei gene noi sau alterate, într-o linie germinativă mamaliană este unul din avantajele tehnologice majore ale biologiei, ce facilitează studiul funcționării genelor în dezvoltare și maladii.

Este cunoscut faptul că transgenele ce conțin ADN genomic cu introni și secvențe reglatorii esențiale se exprimă mult mai bine *in vivo* decât un construct realizat pe baza ADNc (cDNA- *copy DNA*). Una din limitările tehnologiei transgenice standard este incapacitatea de a introduce reproductibil preparate standard din fragmente genomice mai mari de 40-50kp. Aceste obstacole au fost depășite o dată cu cunoștințele recente privind YAC-urile, celulele stem embrionare și tehnologiile de microinjecție pronucleară.

Celulele stem embrionare (SE) sunt celule totipotente care pot fi cultivate indefinit *in vitro* și care pot fi modificate genetic cu precizie, incluzând aici înlocuirea secvențelor ADN și delețiile utilizate în '*knockout*'–urile genice și chiar modificări mult mai subtile ale unei singure perechi de baze. Celulele stem modificate sunt folosite ulterior la producerea de șoareci himerici. Transmiterea ADN prin linia germinativă conduce la producerea de șoareci transgenici ce conțin modificarea genetică indusă.

19. UTILIZAREA YAC-URILOR ÎN TRANSFERUL DE GENE

În prezent sunt folosite trei tehnici diferite de introducere a YAC-urilor în linia germinativă de șoarece (Fig. 20).

19.1. LIPOFECȚIA

Lipofecția presupune izolarea YAC-urilor din celulele de drojdii, purificarea lor de ceilalți cromozomi de drojdie prin electroforeză în câmp pulsatoriu (PFGE – *P*ulsed-*F*ield *G*el *E*lectrophoresis), complexarea ADN de YAC cu diferite lipide și transfecția lui în celule SE. Selecția celulelor SE purtătoare de YAC-uri se realizează prin introducerea, în prealabil, în vectorul YAC a unui marker de selecție (de exemplu gena de rezistență la neomicina – neo^R), prin recombinare omologă la drojdii. Coloniile SE rezistente la G418 (analog al neomicinei) conțin ADN-ul de YAC integrat și exprimă genele, anterior identificate, prezente pe YAC. Eficiența metodei este de ~10% colonii SE purtătoare ale unei copii integrate, intacte și nearanjate genetic a vectorului YAC. Cel mai larg vector YAC introdus prin lipofecție în celulele SE este de 650kpb.

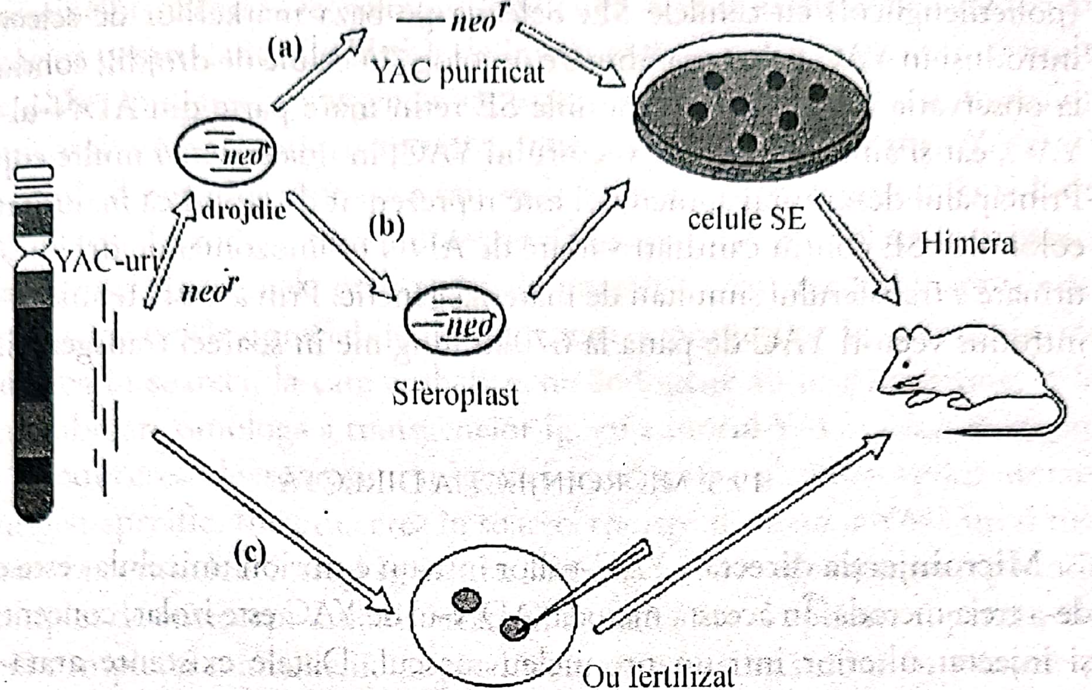


Fig. 20 — Reprezentarea schematică a celor trei metode folosite pentru generarea șoarecilor YAC transgenici. (a) Lipofecția presupune izolarea YAC-urilor conținând un marker de selecție (gena ***neo***^{R}) departe de alți cromozomi de drojdie și introducerea ulterioară a ADN de YAC purificat în celulele SE, prin transfecția mediată de lipide. (b) Fuziunea de sferoplaști constă în introducerea YAC-urilor conținând un marker de selecție într-o celulă SE, prin digestia enzimatică a peretelui celular și fuziunea sferoplaștilor rezultați cu celulele SE. Celulele SE conținând YAC-uri sunt ulterior introduse într-un embrion în stadiu de blastocit, iar trasmiterea prin linia germinativă a ADN din celulele SE generează soareci YAC transgenici. (c) Microinjecția presupune izolarea YAC-urilor de alți cromozomi de drojdie, purificarea, concentrarea și transferul direct al ADN respectiv într-un pronucleu mascul al ouălor de șoarece (după Lamb și Gearhart, 1995).

19.2. FUZIUNEA DE SFEROPLAȘTI

Fuziunea de sferoplaști este o metodă alternativă de introducere a YAC-urilor în celulele SE, prin fuziunea sferoplaștilor de drojdie ce conțin un vector YAC cu celule SE. Peretele celular al drojdiilor este îndepărtat prin digestie enzimatică, urmată de fuziunea mediată de PEG (polietilenglicol) cu celulele SE. Selecția pe baza markerilor de selecție, introduși în YAC prin recombinare omologă în celule de drojdii, conduce la observația că ~40% din coloniile SE rețin mare parte din ADN-ul de YAC, cât și ambele brațe ale vectorului YAC, în una sau mai multe copii. Principalul dezavantaj al metodei este reprezentat de faptul că majoritatea coloniilor SE conțin cantități variate de ADN cromozomal de drojdie, ca urmare a transferului simultan de material genetic. Prin această tehnică s-au introdus vectori YAC de până la 670kb lungime în șoareci transgenici.

19.3. MICROINJECȚIA DIRECTĂ

Microinjecția directă a YAC-urilor într-un embrion unicelular este cea de-a treia metodă. În această metodă, ADN-ul de YAC este izolat, concentrat și injectat ulterior într-un pronucleu mascul. Datele existente arată că eficiența introducerii YAC-urilor în șoarece *via* microinjecție este de <1% oocite injectate, ce dau naștere la șoareci transgenici ce conțin mare parte din vectorul YAC, în contrast cu metoda standard de injectare în pronucleu a unor plasmide mici sau cosmide, ce permite ca ~10% din oocitele injectate să dea naștere la șoareci transgenici. Șoarecii YAC transgenici obținuți prin microinjecție conțin frecvent YAC-uri fragmentate în una sau mai multe copii ADN, integrate în unul sau mai multe situsuri ale genomului. Cel mai mare vector YAC intact transferat prin microinjecție este de 250kpb, fără a exclude transferul unor YAC-uri mult mai mari.

19.4. APLICAȚII ALE TRANSGENEZEI YAC-URILOR LA ȘOARECI

Abilitatea de a transfera regiuni largi de ADN cromozomal clonat la șoareci oferă o oportunitate unică de investigare a numeroaselor aspecte de bază ale cercetării genetice și biologice. Astfel de aplicații includ introducerea de gene largi sau de complexe genice pentru dezvoltarea șoarecilor transgenici ca bioreactoare, generarea unor modele transgenice unice pentru maladiile genetice umane și analiza funcțională a structurii genomice înalt organizată.

Șoarecii transgenici sunt vehicule unice pentru expresia și purificarea proteinelor străine. De exemplu, abilitatea de a introduce locii intacți ai genelor pentru lanțurile H și L de imunoglobuline (ce măsoară mai mult de 2Mb) în șoareci transgenici, cu exprimarea concomitentră a diverșilor anticorpi umani antigen-specifici, este utilă terapiei umane. YAC-uri conținând porțiuni genomice sau ambele gene pentru lanțurile H și L de Ig au fost introduși prin lipofecție și fuziune de sferoplaști în soareci transgenici. În ambele cazuri, genele umane au fost recombinate și s-au înregistrat nivele apreciabile de exprimare a produșilor Ig umani. Introducerea în șoareci, la care ambele gene endogene au fost inactivate, prin recombinare omologă a transgenelor Ig, cu ajutorul YAC-urilor, a condus la producerea de șoareci transgenici ca răspuns al anticorpilor umani antigen-specific. Introducerea în soareci transgenici a unor YAC-uri și mai mari, ce conțin loci întregi Ig pentru lanțurile L și H, a generat un repertoriu complet de anticorpi umani. Strategii similare pot fi aplicate și pentru alți loci complecși mamalieni, cu producere de proteine străine în șoareci.

19.5. ANALIZA GENOMURILOR MAMALIENE

Trangeneza cu YAC-uri permite corelația dintre structura genomică *in vitro* și funcția genomului *in vivo*. Ariile de cercetare asupra cărora tehnologia YAC are un impact imediat includ: identificarea genelor prin complementația mutațiilor existente, reglarea complexelor de gene și a secvențelor reglatorii ce activează de la distanță și structurile genomice înalt ordonate, precum inactivarea cromozomului X și *imprinting*-ul genomic.

Cercetările au urmărit imaginarea unor tehnici utile în cartarea fizică și caracterizarea moleculară a mutațiilor la șoareci. Transgeneza cu YAC-uri permite introducerea unor segmente genomice mari pentru complementarea funcțională a mutațiilor recesive existente. YAC-urile cu complementație *in vivo* pot fi ulterior fragmentate sau deletate, la nivelul secvențelor specifice, prin recombinare omologă în drojdii, urmată de reintroducerea în șoareci transgenici pentru a defini secvențele ADN responsabile. În plus, secvențele ADNc codificatoare de pe YAC-uri pot fi identificate rapid prin tehnici precum selecția directă și *trapping*-ul exonilor. Combinarea acestor studii ar trebui să permită identificarea precisă a deficiențelor genetice responsabile de numeroase mutații la șoareci. În acest sens, un exemplu este oferit de studiul mutației *albino* – mutație recesivă ce conduce la absența pigmentației în melanocite și a epiteliului retinei, ca și la apariția unor căi neuronale anormale proiectate din retină. Defectul genetic *albino* implică mutații în gena tirozinazei al cărei produs este o enzimă cheie în sinteza melaninei. După introducerea unui YAC de 250kb, conținând gena tirozinazei de 80kbp, prin microinjecție într-un șoarece transgenic, s-a constat că ARNm codificat de transgenă prezintă nivele comparabile cu cele ale genei endogene, într-o manieră dependentă de numărul de copii. De asemenea, s-a constatat că transgena a corectat nu numai absența pigmentației în melanocite ci și căile anormale retinale.

Studiile complexelor de gene și a secvențelor reglatoare ce acționează la distanță sunt facilitate de avantajele oferite de trangeneza cu YAC-uri. În acest sens, s-a încercat studierea expresiei genelor pentru β-globina umană la șoareci, utilizând YAC-uri ca vectori de clonare. Locusul β-globinei conține 5 gene funcționale aranjate pe cromozom în ordinea în care sunt exprimate în evoluție. Exprimarea genelor β-globinei este reglată precis într-o manieră eritroid-specifică și dependentă de stadiul de dezvoltare. Diferitele secvențe reglatoare, măsurând >150kb, sunt implicate în *pattern*-ul coordonat al expresiei, fapt pentru care studiile *in vivo* vizând întregul locus sunt dificile. Introducerea unui YAC de 248 sau 150kb ce conține locusului β-globinei într-un șoarece transgenic, prin microinjecție, a condus la exprimarea temporală și cu specificitate de țesut a celor 5 gene din locusul β-globinei.

Transgeneza cu YAC-uri va permite analiza mult mai completă a funcției și structurii înalt ordonate a genomului mamalian, incluzând aici inactivarea cromozomului X, *imprinting*-ul genomic, domeniile cromozomale, originile replicării și centromerele. Inactivarea cromozomului X, de exemplu, este un proces complex ce implică silențierea transcripțională randomică a unui cormozom X la femele (XX). Studiile efectuate pe șoareci și om au demonstrat că inactivarea cromozomului X este dependentă de un centru de inactivare X. Una din genele implicate în inactivarea cromozomului X este gena x*ist* care, la om, codifică un transcript de 17kpb exprimat exclusiv de către cromozomul X inactivat. Deși unele date confirmă implicarea ARNm Xist în inițierea inactivării cromozomului X, este încă neclar dacă proteina Xist este implicată și în menținerea inactivării cromozomului X. Evidențierea mult mai clară a rolului jucat de gena *xist* și de alte gene în inactivarea cromozomului X ar fi posibilă prin introducerea regiunilor largi ale complexului de inactivare, clonate în prealabil în YAC, în celulele SE și apoi într-un șoarece transgenic. Secvențele ADN critice ar putea fi apoi definite și analizate prin manipularea specifică a YAC-urilor, prin recombinarea omologă în drojdii, înainte de transferul în celule SE. Strategii similare ar putea fi extrem de utile în corelarea informației structurale obținută pentru genomul mamalian cu analiza funcțională a întregului organism.

19.6. MODELE DE MALADII UMANE

Introducerea de regiuni mari genomice clonate în soareci transgenici are implicații majore și în dezvoltarea de modele animale pentru maladiile umane, în mod particular pentru producerea de modele animale pentru duplicațiile ADN ce apar în maladiile umane (boala Charcot-Marie-Tooth, de tip 1A), ca și dezechilibrele de dozaj cromozomal (trisomii umane 13, 18 și 21). Trisomia 21 (sindromul Down-SD) este cea mai comună aneuploidie printre nou-născuți, ce prezintă o serie de trăsături fenotipice adiționale retardării mentale, incluzând boli cardiace congenitale, anomalii ale membrelor, caracteristici faciale și maladia neuropatologică Alzheimer (MA). Cercetările au urmărit definirea cu acuratețe a caracteristicilor fenotipice ale SD și identificarea secvențelor ADN ale cromozomului 21 ce contribuie la trăsăturile sindromului (Fig. 21.). Astfel, regiuni genomice discrete ale cromozomului 21, clonate în YAC-uri, au fost introduse în soareci transgenici, în încercarea de a corela dezechilibrul de dozaj al genelor discrete cu manifestările specifice sindromului. De exemplu, s-a testat ipoteza conform căreia dezechilibrul de dozaj și supraexprimarea genei *app* (*amyloid precursor protein*) de pe cromozomul 21 conduce la caracteristicile fenotipice și neuropatologice ale MA și/sau SD în modelele animale. Gena *app* este extrem de mare, conține 18 exoni cu 3 ARN-uri majore ce suferă un *splicing* alternativ, exprimate într-o manieră cu specificitate de țesut și de stadiu de dezvoltare. Pentru aceasta, un YAC de 650kp (ce conține gene *app* de 400kb) a fost introdus prin lipofecție într-un șoarece transgenic. Proteina APP este o proteină integrală de membrană, ce dă naștere la un peptid β-amiloid (A^{β}) de 39-42 aminoacizi ce se găsește în depozite fibrilare, dense, în creierul indivizilor cu MA și SD.

Corespunzător modelului de dezechilibru de dozaj, șoarecii APP transgenici produc nivele ridicate de ARNm APP uman și proteină, reflectând exprimarea produșilor APP endogeni de șoarece atât în creier, cât și în țesuturile periferice. În plus, neuronii de la șoarecii YAC transgenici produc peptidul uman A^{β} la nivele similare cu peptidul A^{β} de la șoareci. Deși la aceste modele animale nu s-au evidențiat depozite amiloide sau alte trăsături neuropatologice corespunzătoare SD sau MA, ele continuă să fie examinate pentru anomalii mult mai subtile. Pe langă gena *app*, alte regiuni genomice specifice de pe cromozomul 21 (genele *sod1*, *gart* și *aml-1*), clonate în YAC-uri, au fost introduse în șoareci transgenici, în încercarea de a examina efectul dezechilibrului de dozaj pentru anumite gene studiate atât independent cât și combinat.

Tehnologia transgenezei cu ajutorul YAC-urilor este utilă în întelegerea rolului jucat de genele complexe mari în etiologia a numeroase defecte genetice dominante.

20. CICLUL DE VIAȚĂ ȘI DIVIZIUNEA CELULARĂ LA *S.CEREVISIAE*

Spre deosebire de celelalte eucariote, celulele de *S.cerevisiae* se caracterizează printr-un ritm de creștere și de multiplicare rapid, astfel că o celulă se poate divide la fiecare 120 minute.

Ciclul de viață al tulpinilor de *S.cerevisiae* utilizate în mod curent în laborator este constituit din alternanța haplofazei cu diplofaza. În haplofază, celulele haploide (n) aparțin la două tipuri opuse de împerechere desemnate ca MAT**a** (*mating type a*) și MAT**α** (*mating type α*). Două astfel de celule pot fuziona, dând naștere unei tulpini diplode MATa/α. Epuizarea nutrienților din mediu induce intrarea celulelor diploide în meioză, la finalul căreia se vor forma 4-8 celule haplode (ascospori). Formarea tulpinilor diploide, pornind de la celule haploide, este folosită în mod curent la stabilirea grupelor de complementație și la atribuirea unui fenotip recesiv sau dominant unor alele mutante.

În celulele eucariote, sinteza ADN este restrânsă la faza **S** (*synthesis*) a ciclului celular. Această perioada este precedată de perioada **G1** (*gap*), în

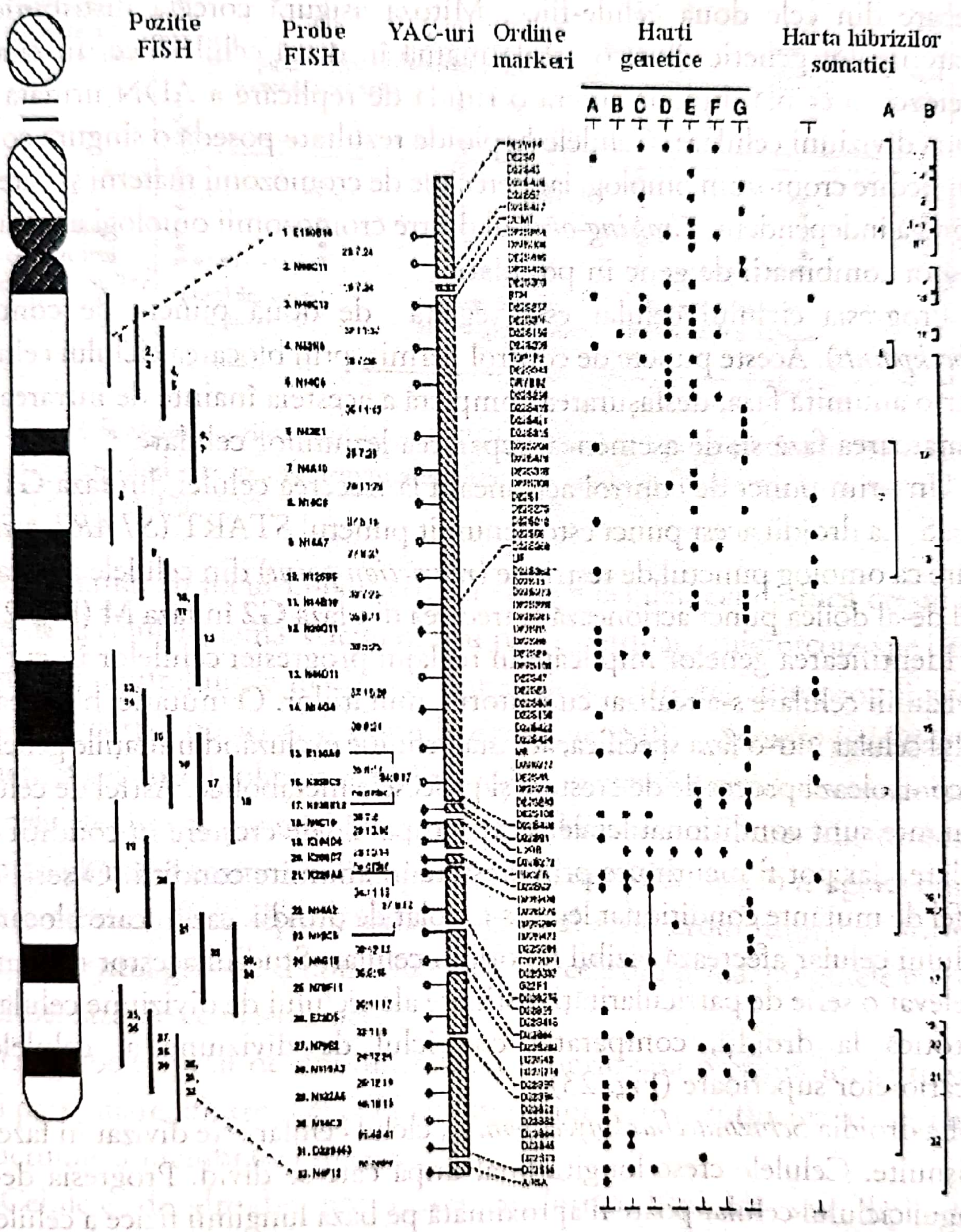

Pozitie FISH
Probe FISH
YAC-uri
Ordine markeri
Harti genetice
A B C D E F G
Harta hibrizilor somatici
A B

Fig. 21 — Integrarea datelor despre cromozomul uman 22.

cursul căreia are loc sinteza diferitelor tipuri de ARN și a proteinelor, și este urmată de perioada **G2**. Faza **M** (mitoza sau diviziunea celulară) urmează perioadei **G2** și presupune condensarea cromozomilor duplicați, alinierea lor în placa metafazică, separarea cromatidelor-surori și segregarea lor în fiecare din cele două celule-fiice. Mitoza asigură corecta distribuție a materialului genetic dintr-o celulă-mamă în două celule-fiice. In cursul meiozei, o celulă diplodă suferă o rundă de replicare a ADN urmată de două diviziuni celulare. Celulele haploide rezultate posedă o singură copie din fiecare cromozom omolog, iar perechile de cromozomi materni și paterni segregă independent. *Crossing-over*-ul dintre cromozomii omologi este sursa de noi combinații de gene în populație.

Progresia ciclului celular este reglată de două puncte de control (*checkpoints*). Aceste puncte de control permit, prin blocarea ciclului celular într-o anumită fază, desfașurarea completă a acesteia înainte de intrarea în următoarea fază și, de asemenea, repararea leziunilor celulare.

Un prim punct de control acționează la trecerea celulei din faza **G1** în faza **S**. La drojdii acest punct este denumit punctul START (*START point*) și are ca omolog punctul de restricție (*restriction point*) din celulele animale. Cel de-al doilea punct acționează la trecerea din faza **G2** în faza **M** (Fig. 22).

Identificarea genelor implicate în reglajul progresiei celulelor în cursul diviziunii celulare s-a realizat cu ajutorul mutațiilor. O mutație blochează ciclul celular într-o fază specifică, această definiție excluzând mutațiile genelor ce controlează procesele de creștere și procesele metabolice. Astfel de celule mutante sunt condiționat letale, sunt incapabile de creștere în condiții de izolare, dar pot fi menținute prin creștere în anumite condiții. O serie de astfel de mutante condiționat letale s-a izolat de drojdii, caz în care blocarea ciclului celular afectează vizibil fenotipul celular. Studiul acestor mutante a relevat o serie de particularități distincte ale ciclului de diviziune celulară mitotică la drojdii, comparativ cu ciclul de diviziune al celulelor eucariotelor superioare (Fig. 23).

La drojdia *Schizosaccharomyces pombe*, ciclul celular este divizat în fazele obișnuite. Celulele cresc longitudinal după care se divid. Progresia de-a lungul ciclului celular poate fi aproximată pe baza lungimii fizice a celulei, care practic se dublează (de la 7-8μm se ajunge la 14-16 μm).

La *S. cerevisiae*, ciclul de diviziune este particular. Din faza **S**, celulele intră aproape direct în diviziune, astfel că faza **G2** este foarte scurtă sau

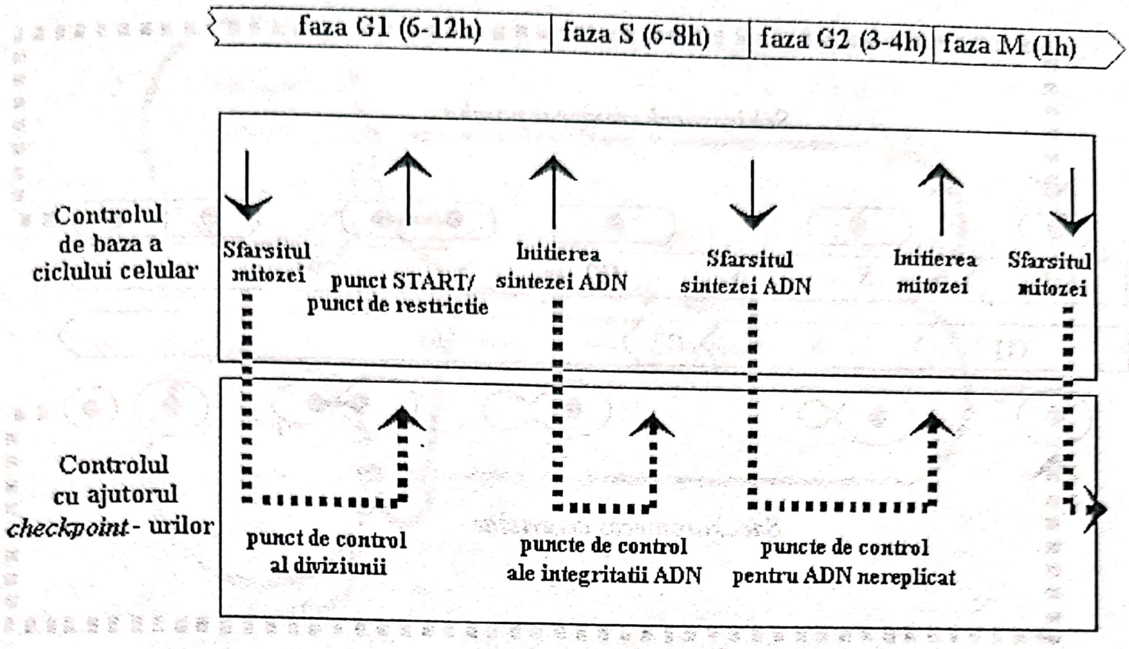

faza G1 (6-12h)
faza S (6-8h)
faza G2 (3-4h)
faza M (1h)
Controlul de baza a ciclului celular
Sfarsitul mitozei
punct START/ punct de restrictie
Initierea sintezei ADN
Sfarsitul sintezei ADN
Initierea mitozei
Sfarsitul mitozei
Controlul cu ajutorul *checkpoint* - urilor
punct de control al diviziunii
puncte de control ale integritatii ADN
puncte de control pentru ADN nereplicat

Fig. 22 — ***Checkpoint***-urile controlează abilitatea celulei de a progresa de-a lungul ciclului celular, permitând trecerea la următoarea fază, numai după finalizarea fazei precedente (după Lewin, 1997).

chiar absentă. În locul unei diviziuni egale a celulei, celula-fiică crește ca mugure al celulei-mamă. Ciclul celular poate fi urmărit microscopic pe baza creșterii mugurelui. Pe măsură ce mugurele se mărește, cromozomii sunt atașați la corpii polari ai fusului de diviziune (SPB - *Spindle Pole Body*), structură a căreia duplicare se realizează într-o manieră similară centriolilor din celulele animale, semnalizând începutul diviziunii nucleare. Microtubulii formați ghidează cromozomii duplicați, unul din SPB intră în mugure, după care cromozomii se separă, astfel că la final setul cromozomal va forma complementul genetic al noii celule-fiice. În cele din urmă, mugurele matur se eliberează de celula-mamă.

La ambele specii de drojdii, mitoza propriu-zisă prezintă unele trăsături particulare, dintre care cea mai importantă este menținerea integrității structurale a membranei nucleare.

Celulele de drojdie pot exista în formă haploidă sau diploidă, prezentând două forme ale ciclului de viata – haplofaza și diplofaza. O celula haploidă poate prezenta unul din cele două tipuri de împerechere: **a** sau **α**. Haploizii cu tip opus de împerechere intră în calea de împerechere

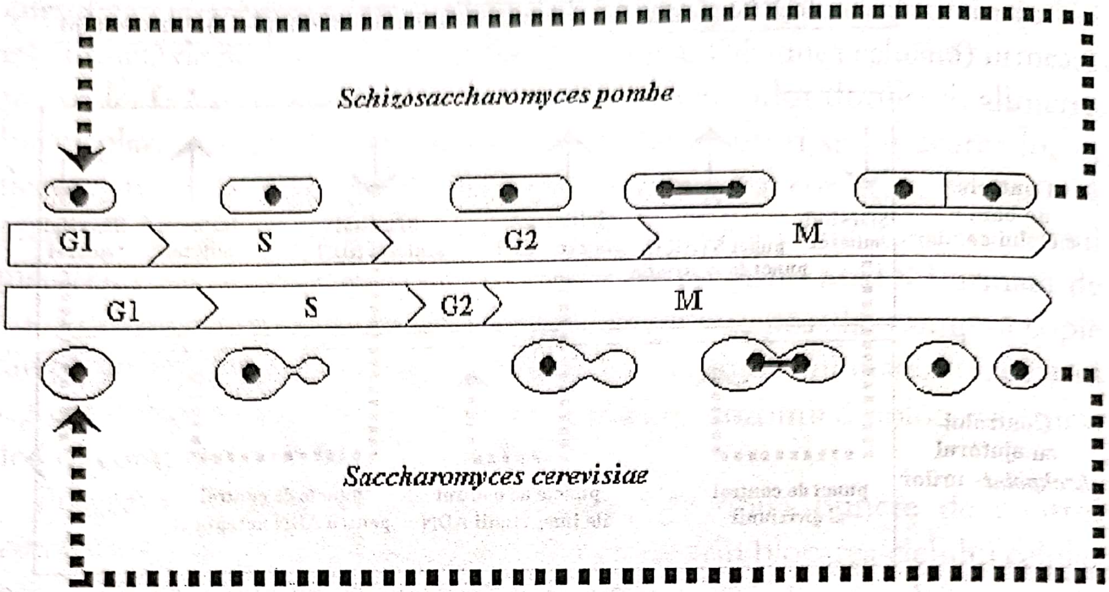


Fig. 23 — Ciclul de diviziune celulară mitotică la drojdii. Celulele de ***S.pombe*** își dublează dimensiunea după care se divid în cursul unui ciclu celular convențional. Celulele de ***S.cerevisiae*** înmuguresc în cursul ciclului celular, în care faza G2 este foarte scurtă sau absentă, iar faza M ocupă cea mai mare parte (după Lewin, 1997).

sexuată, în care aceștia fuzionează formând celule diploide care, prin sporulare, dau naștere la celule haploide în urma diviziunii meiotice (Fig. 24.)

Punctul START din ciclul celular de la drojdii este esențial pentru comportamentul celulelor haploide. Prin acest punct plasat în faza **G1** timpurie a ciclului celular, se decide calea pe care o va urma o celula haploidă: intrarea în ciclul de diviziune sau împerecherea. Luarea acestei decizii, în faza **G1** timpurie, este influențată de prezența în mediu a feromonilor de conjugare (polipeptide cu rol de factori de împerechere).

La *S.pombe* s-au identificat diferite mutante cdc (*cell division cycle*) ce blochează ciclul celular în unul din cele două stadii: în faza **G1** la punctul START, sau la granița dintre faza **G2** și **M** (Fig. 25.).

Dintre genele implicate în ciclul celular la *S.pombe*, produsul genei *cdc2* se dovedește a fi un reglator-cheie, prin implicarea sa în ambele stadii ale blocării ciclului celular. Gena *cdc2* este omologă genei *cdc28* de la *S.cerevisiae* și genei *p34* de la *Xenopus sp.*

Proteina Cdc2 are parteneri diferiți în fiecare fază a ciclului celular: în mitoză, formează împreună cu proteina Cdc13 o kinază specifică fazei M

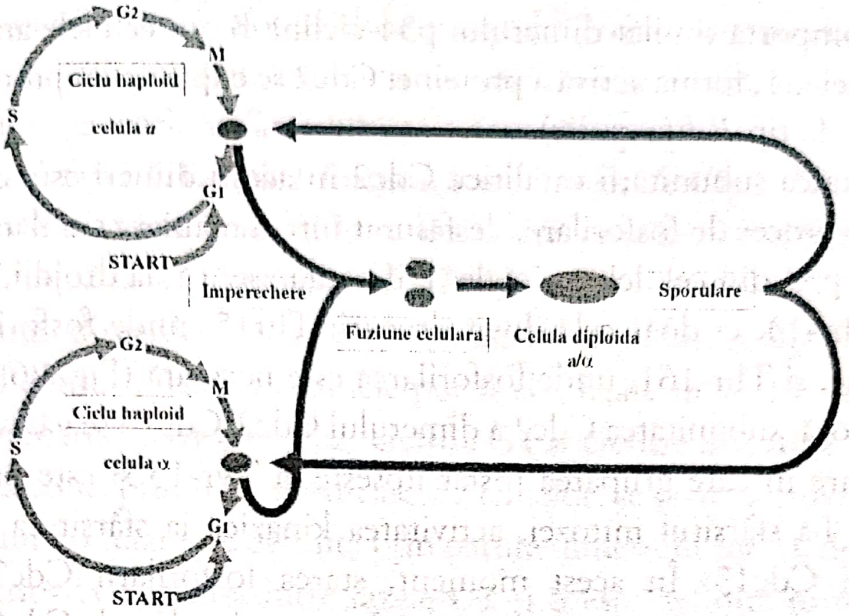

G2
M
Ciclu haploid
celula a
S
G1
START
Imperechere
Fuziune celulara
Celula diploida a/α
Sporulare
G2
M
Ciclu haploid
celula α
S
G1
START

Fig. 24 — Celulele haploide de drojdie cu tip de imperechere a sau α se pot reproduce printr-un ciclu mitotic. Prin fuziunea a două celule cu tip opus de imperechere rezultă un zigot diploid a/α. Prin sporulare, celulele diploide generează spori haploizi de tip a și α (după Lewin, 1997).

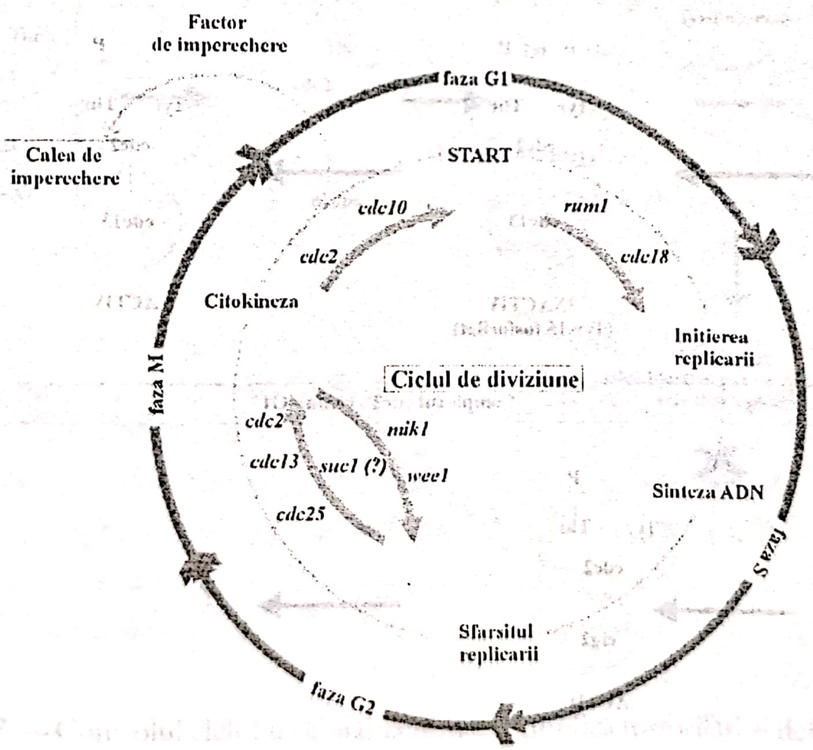

Factor
de imperechere
faza G1
Calea de
imperechere
START
cdc10
rum1
cdc2
cdc18
Citokineza
Initierea
replicarii
Ciclul de diviziune
faza M
cdc2
nik1
cdc13
suc1 (?)
wee1
cdc25
Sinteza ADN
faza S
Sfarsitul
replicarii
faza G2

Fig. 25 — Ciclul celular la ***S.pombe*** (după Lewin, 1997).

care se comportă similar dimerului p34-ciclina B din celulele animale. În cursul fazei G1, forma activă a proteinei Cdc2 se cuplează cu proteina Cig2 (proteina de tip *B-like cyclin*).

Activitatea subunității catalitice Cdc2 în acești dimeri este controlată printr-un proces de fosforilare, desfășurat într-o manieră similară cu cea a proteinei p34 din celulele animale. Diferența este că, la drojdii, nu există situsul Thr-14, ci doar cele două situsuri: Thr15, unde fosforilarea este inhibitorie, și Thr-161, unde fosforilarea este necesară (Fig. 26.).

În mitoză, subunitatea Cdc2 a dimerului Cdc2/Cdc13 se găsește în stare activă, stare în care gruparea fosfat lipsește la Tyr-15 și este prezentă la Thr-161. La sfârșitul mitozei, activitatea kinazică ia sfârșit ca urmare a degradării Cdc13. În acest moment, starea fosforilării Cdc2 rămâne nemodificată. O dată cu sinteza unei noi forme moleculare de Cdc13, aceasta se asociază cu Cdc2, dar complexul dimeric este menținut în stare inactivă

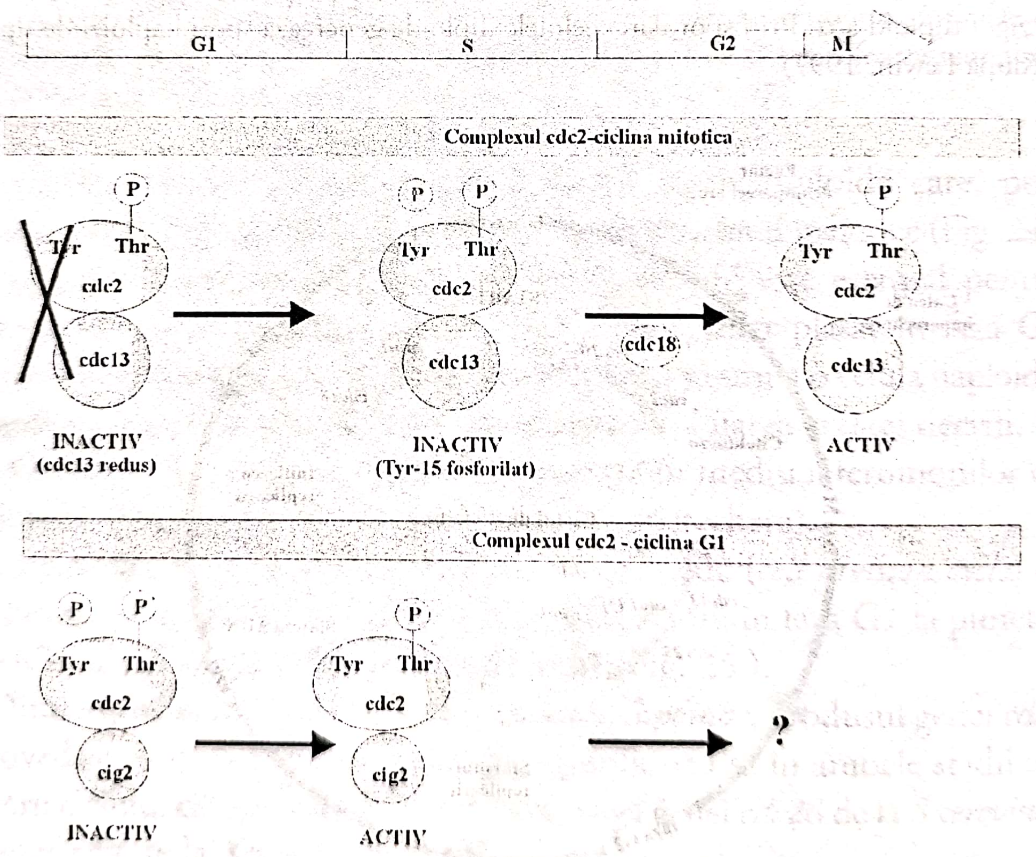

G1
S
G2
M
Complexul cdc2-ciclina mitotica
P
Tyr
Thr
cdc2
cdc13
INACTIV
(cdc13 redus)
P
P
Tyr
Thr
cdc2
cdc13
INACTIV
(Tyr-15 fosforilat)
cdc18
P
Tyr
Thr
cdc2
cdc13
ACTIV
Complexul cdc2 - ciclina G1
P
P
Tyr
Thr
cdc2
cig2
INACTIV
P
Tyr
Thr
cdc2
cig2
ACTIV
?

Fig. 26— Ciclul celular la ***S.pombe*** este definit prin formele complexelor Cdc2-ciclina (după Lewin, 1997).

de către proteina Rum1. Totuși, după punctul START, activitatea dimerului Cdc2/Cdc13 este inhibată prin adiționarea unui grupări fosfat la Tyr-15. Îndepărtarea grupării fosfat inhibitorie activează mitoza.

În cursul fazei **G1**, Cdc2 formează un dimer cu Cig2. Dimerul este convertit de la starea inactivă la starea activă prin defosforilarea restului Tyr-15 al Cdc2 la sau după situsul START.

Existența dimerilor alternativi în cursul ciclului celular sugerează conceptul conform căruia ciclinele pot fi clasificate în acord cu perioada lor de parteneriat activ cu Cdc2: **cicline G1** și **cicline mitotice (sau G2)**.

Pe baza conceptului de clasificare a ciclinelor, se poate afirma că fiecare fază a ciclului celular este definită prin natura dimerului activ Cdc2-ciclina. Astfel, perioada cuprinsă între fazele **G1** și **S** este definită prin prezența dimerului activ Cdc2-ciclina G1, în vreme ce perioada inclusă între faza **G2** și mitoza este caracterizată printr-un dimer activ Cdc2-ciclină mitotică.

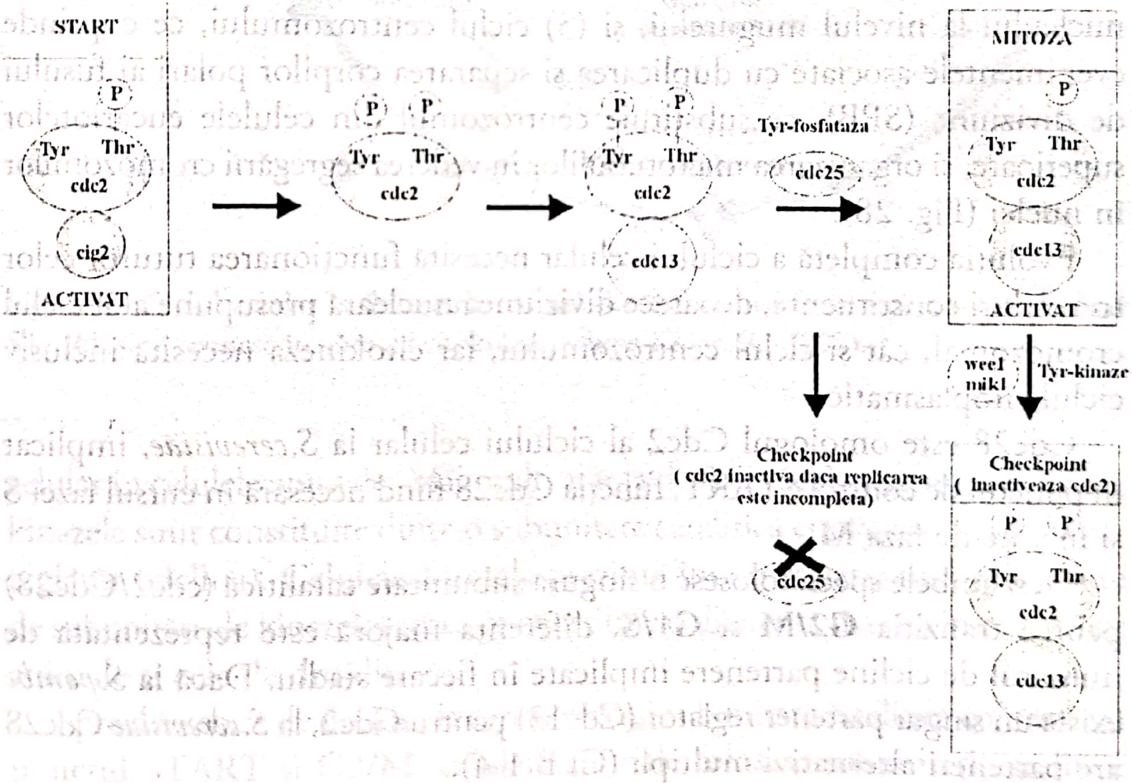

START
P
Tyr
Thr
cdc2
cig2
ACTIVAT
P
P
Tyr
Thr
cdc2
P
P
Tyr
Thr
cdc2
cdc13
Tyr-fosfataza
cdc25
MITOZA
P
Tyr
Thr
cdc2
cdc13
ACTIVAT
wee1
mik1
Tyr-kinaze
Checkpoint
(cdc2 inactiva daca replicarea este incompleta)
cdc25
Checkpoint
(inactiveaza cdc2)
P
P
Tyr
Thr
cdc2
cdc13

Fig. 27 — Controlul ciclului celular la *S.pombe* implică fosforilări și defosforilări succesive ale Cdc2. Punctele de control operează prin influențarea statutului resturilor Tyr și Thr (după Lewin, 1997).

La *S.pombe*, activitarea reglatorului cheie Cdc2 este controlată de activitățile fosfatazelor (Cdc25) și kinazelor (Wee1) care, la rândul lor, sunt stimulate de diferite semnale extra- și intracelulare (Fig. 27.). Prin Cdc2, semnalele percepute de celulă sunt integrate într-o decizie ce vizează evoluția ciclului celular. Cdc25 este o componentă a punctului de control ce asigură completa desfășurare a fazei **S**, înainte de activarea fazei **M**, produsul genei *cdc25* fiind necesar pentru defosforilarea Cdc2 din dimerul Cdc2/Cdc13.

Produsul genei *wee1* are o activitate antagonistă Cdc25, Wee1 făcând parte din punctul de control ce previne activarea Cdc2 până în momentul în care dimensiunea celulei este adecvată inițierii mitozei. Wee1 este o kinază ce acționează pe Tyr-15, inhibând funcția Cdc2.

Spre deosebire de *S.pombe*, la *S.cerevisiae* se diferențiază mai multe tipuri de cicluri conectate în puncte cruciale : (1) ciclul cromozomal, ce cuprinde evenimentele necesare duplicării și separării cromozomilor, evenimente ce corespund inițierii, continuării și finalizării fazei **S** și a diviziunii nucleare, (2) ciclul citoplasmatic, ce constă în emergența mugurelui și migrarea nucleului la nivelul mugurelui, și (3) ciclul centrozomului, ce cuprinde evenimentele asociate cu duplicarea și separarea corpilor polari ai fusului de diviziune (SPB), ce substituie centrozomul din celulele eucariotelor superioare, și organizarea microtubulilor în vederea segregării cromozomilor în nuclei (Fig. 28).

Evoluția completă a ciclului celular necesită funcționarea tuturor celor trei cicluri constituente, deoarece diviziunea nucleară presupune atât ciclul cromozomal, cât și ciclul centrozomului, iar citokineza necesită inclusiv ciclul citoplasmatic.

Cdc28 este omologul Cdc2 al ciclului celular la *S.cerevisiae*, implicat în punctul de control START, funcția Cdc28 fiind necesară în cursul fazei **S** și înainte de faza **M**.

Deși ambele specii folosesc o singură subunitate catalitică (cdc2/Cdc28) pentru tranziția **G2/M** și **G1/S**, diferența majoră este reprezentată de numărul de cicline partenere implicate în fiecare stadiu. Dacă la *S.pombe* există un singur partener reglator (Cdc13) pentru Cdc2, la *S.cerevisiae* Cdc28 are parteneri alternativi multipli (CLB 1-4).

Conservarea structurii kinazei M, de la celulele animale și drojdii, și implicarea unor dimeri relativ similari ce reglează punctul START la *S.pombe* și *S.cerevisiae*, sugerează existența unei scheme similare de control a ciclului

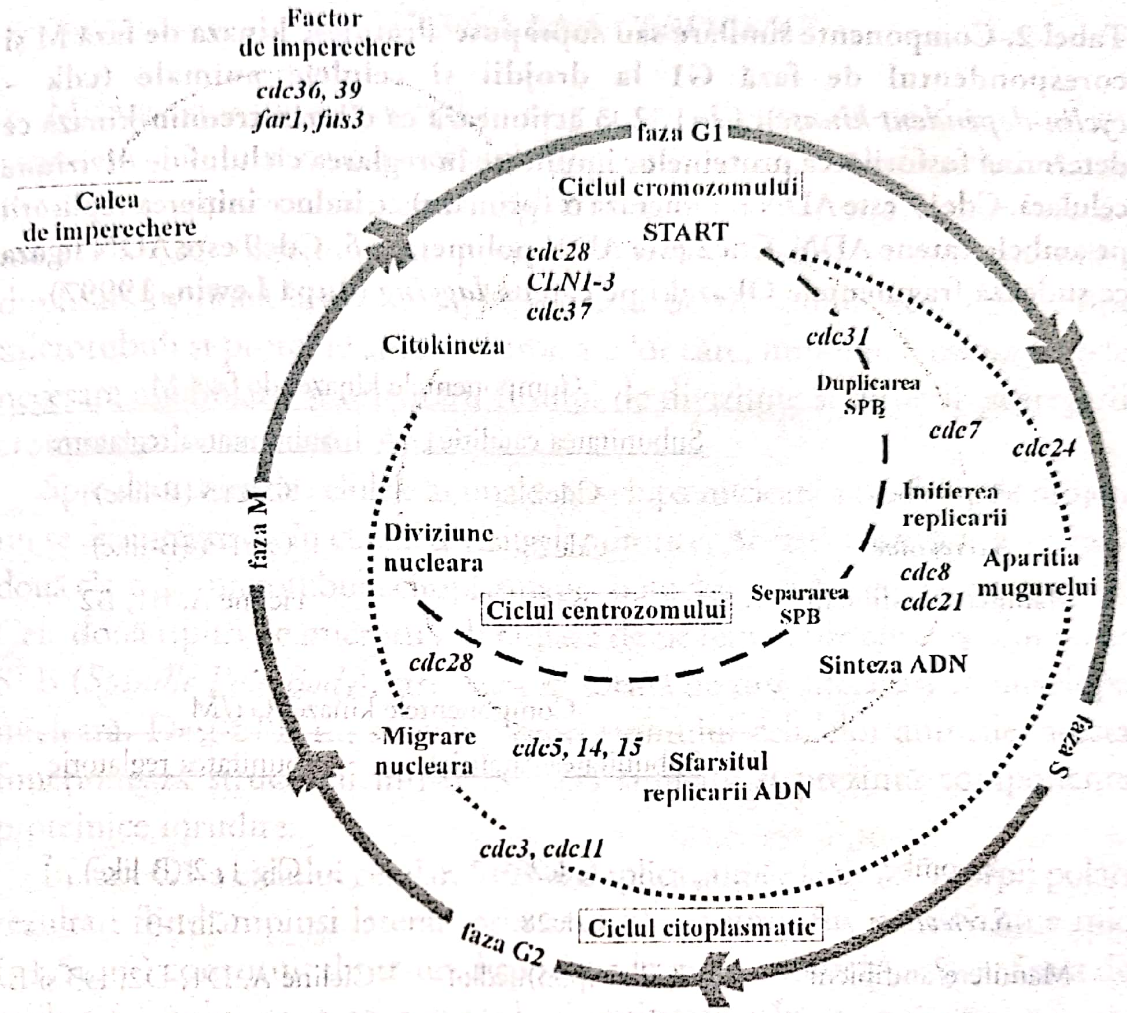

Factor
de imperechere
cdc36, 39
far1, fus3
Calea
de imperechere
faza G1
Ciclul cromozomului
START
cdc28
CLN1-3
cdc37
Citokineza
cdc31
Duplicarea
SPB
cdc7
cdc24
Initierea
replicarii
faza M
Diviziune
nucleara
Ciclul centrozomului
Separarea
SPB
cdc8
cdc21
Aparitia
mugurelui
cdc28
Sinteza ADN
faza S
Migrare
nucleara
cdc5, 14, 15
Sfarsitul
replicarii ADN
cdc3, cdc11
Ciclul citoplasmatic
faza G2

Fig. 28— Ciclul celular la *S.cerevisiae* constă din trei cicluri ce se separă după punctul START și se reunesc înainte de citokineză (după Lewin B., 1997).

celular în celulele animale. Mai mult, atât la drojdii cât și în celulele animale, kinazele sunt constituite dintr-o subunitate catalitică cuplată cu un partener reglator (ciclina). Celulele animale prezintă însă o variație mult mai mare de subunități ale kinazelor, ceea ce constituie o diferentă majoră între celulele animale și cele de drojdii.

Spre deosebire de drojdii, la care o aceeași subunitate catalitică controlează punctul START și **G2/M**, celulele animale folosesc subunități catalitice pentru **G1/S** diferite de subunitatea catalitică mitotică, având și un număr mult mai mare de cicline (Tabel 2.).

Tabel 2. Componente similare sau suprapuse alcătuiesc kinaza de fază M și corespondentul de fază G1 la drojdii și celulele animale (cdk – *cyclin-dependent kinase*). Cln1, 2, 3 acționează ca o serin-treonin-kinază ce determină fosforilarea proteinelor implicate în reglarea ciclului de diviziune celulară. Cdc17 este ADN polimeraza α (primaza) ce induce inițierea replicării pe ambele catene ADN. Cdc2 este ADN polimeraza δ. Cdc9 este ADN ligaza ce sudează fragmentele Okazaki pe catena *lagging* (după Lewin, 19997).

	Componentele kinazei de fază M	
	Subunitatea catalitică	Subunitatea reglatorie
S.pombe	Cdc2	Cdc13 (B-like)
S.cerevisiae	Cdc28	Clb1-4 (B-like)
Mamifere/ amfibieni	p34	cicline A, B1, B2

	Componentele kinazei G1/M	
	Subunitatea catalitică	Subunitatea reglatorie
S.pombe	Cdc2	Cig 1, 2 (B-like)
S.cerevisiae	Cdc28	Cln1-3
Mamifere/amfibieni	Cdk2 (p33), cdk4	Cicline A, D1, D2, D3 și E

În cursul fazei G1, celulele animale au numeroase kinaze implicate în controlul ciclului celular, care variază atât în subunitatea catalitică, cât și în cea reglatorie, în contrast cu situația prezentă la drojdii, la care se înlocuiește doar subunitatea reglatoare.

21. MITOZA LA *S.CEREVISIAE*

Mitoza reprezintă procesul în care o celulă preexistentă distribuie cu acuratețe și în mod egal materialul său genetic celor două celule-fiice. Acest proces presupune participarea fusului de diviziune mitotic, aparat macromolecular ce funcționează pentru segregarea fizică a cromozomilor duplicați în două seturi complete. Fusul de diviziune este alcătuit din microtubuli și proteine „motor" asociate lor care, impreună, crează forțele necesare asamblării și orientării fusului de diviziune și dirijării segregării cromozomilor în cursul Anafazei.

Spre deosebire de celulele animale, anvelopa nucleară a celulelor de drojdii nu se dezintegrează în cursul diviziunii mitotice. Această barieră fizică crează două clase de microtubuli, citoplasmatici și nucleari, ce funcționează distinct. Cele două tipuri de microtubuli radiază de pe fețe opuse ale corpului polar SPB (*Spindle Pole Body*), structură în formă de disc inclavată în anvelopa nucleară. Deși SPB nu seamănă centrozomului celulelor animale, acesta funcționează structural într-o manieră similară și prezintă componente proteinice inrudite.

În faza **G1** a ciclului celular, SPB se duplică „umăr la umăr", corpii polari rezultați fiind împinși lateral, prin asamblarea unui fus de diviziune mic (~1.5mm) constituit dintr-un dispozitiv de microtubuli bipolari. Zona de mijloc a fusului conține microtubuli antiparaleli în strânsă proximitate, microtubuli proveniti de la cei doi poli. Interacțiile dintre acești microtubuli antiparaleli sunt esențiale pentru structura fusului bipolar. Cromatidele-surori se atașează la fusul de diviziune, deși momentul acestui eveniment încă nu a fost stabilit. De asemenea, se pare că nu există un eveniment în care cromozomii atasați se deplasează la placa metafazică în centrul fusului de diviziune. Fiecare cromozom se leagă la un singur microtubul de la fiecare pol prin intermediul unui complex relativ simplu ADN centromeric-kinetocor. Atașarea bipolară a tuturor cromozomilor la un fus de diviziune asamblat semnalizează intrarea celulei în Anafază, faza de segregarea a cromozomilor.

Anafaza la *S.cerevisiae* se desfașoară în câteva stadii discrete. Cromozomii se separă și migrează către poli de-a lungul microtubulilor în Anafaza A. Ca urmare a distanței mici dintre poli în fusul de diviziune preanafazic, Anafaza A contribuie foarte puțin la separarea spațială a cromozomilor de drojdie. Cea mai mare parte a separării cromozomilor are loc în Anafaza B, în care SPB și setul de cromatide strâns asociate lor sunt separați printr-o distanță de 6-7x mai mare decât distanța preanafazică (~10mm). La rândul său, Anafaza B se desfășoară în 2 etape: o etapă de elongare rapidă (1-2mm/min) în care fusul capătă jumatate din lungimea sa finală, urmată de o etapă de elongare lentă (0.2mm/min) până la dimensiunea finală a fusului. În Telofază, fusul de diviziune este dezasamblat, cu evoluția rapidă a citokinezei.

La *S.cerevisiae,* diviziunea mitotică este asimetrică și se realizează prin înmugurire. Prin urmare, este esențial pentru segregarea corectă a nucleilor progeni ca fusul de diviziune să fie deplasat la granița dintre celula-mamă și mugure. Acest proces este de fapt o migrare nucleară, deoarece întregul conținut nuclear este deplasat o dată cu fusul de diviziune. Poziționarea fusului de diviziune este unul din aspectele esențiale ale tuturor proceselor de diviziune mitotică la eucariote, în celulele animalelor multicelulare poziția fusului de diviziune determinând planul de clivare din citokineză. Poziționarea fusului de diviziune la *S.cerevisiae* începe în cursul asamblării acestuia (în fazele **G1** și **S**) și este acompaniată exclusiv de microtubulii citoplasmatici, echivalenții funcționali ai microtubulilor astrali ai celulelor eucariotelor superioare. Acești microtubuli citoplasmatici, prin dinamica lor, se conectează la structura existentă în cortexul mugurelui în curs de formare, stabilirea acestor conexiuni direcționând migrarea fusului/nucleului către granița celulă-mamă și mugure. În Anafază, fusul de diviziune este poziționat paralel cu axa celulă-mamă - mugure. Unul din polii fusului este împins la graniță și apoi pătrunde în mugure ca rezultat al elongării, în vreme ce celălalt pol este reținut în celula-mamă.

Elongarea și poziționarea fusului de diviziune bipolar sunt evenimente în care sunt implicate o serie de molecule ‚motor' ce cooperează în Anafază în vederea separării nucleilor progeni.

22. MOTOARE MITOTICE LA *S.CEREVISIAE*

S.cerevisiae oferă o oportunitate unică pentru studiul proteinelor „motor" ce participă la funcționarea fusului de diviziune mitotic. Motoarele moleculare mitotice de la *S.cerevisiae* reprezintă singurul sistem în care toți participanții sunt cunoscuți și pot fi manipulați genetic. În genomul de *S.cerevisiae* este prezent un set relativ mic de gene ce codifică o singură dineină citoplasmatică și 6 proteine înrudite kinezinei (Cin8, Kar3, Kip1, Kip2, Kip3 și Smy1) implicate în funcționarea fusului de diviziune (Fig. 29.).

Fiecare proteină motor are o secvență unică de aminoacizi (Fig. 30.). Abilitatea de a crea și analiza mutante multiple a permis disecția

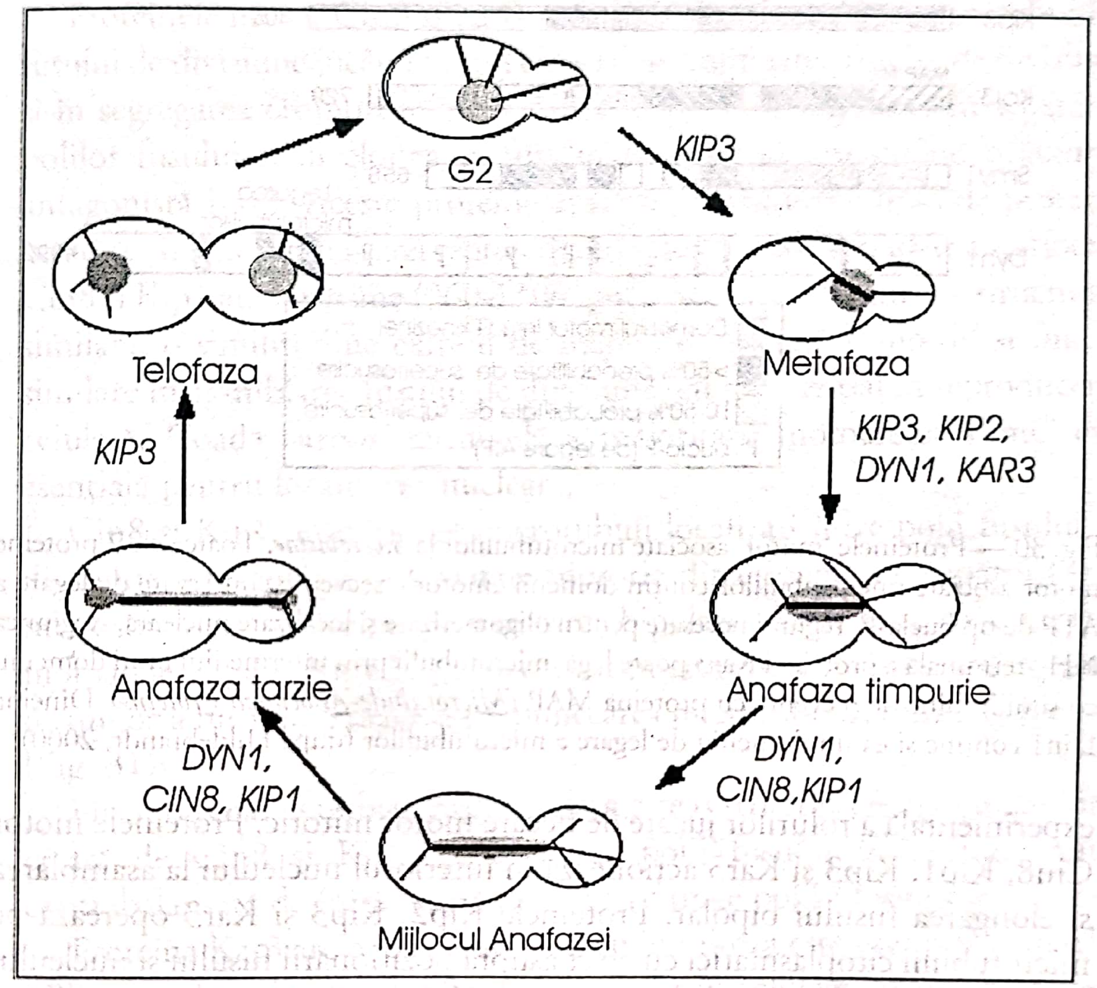

G2
KIP3
Metafaza
KIP3, KIP2,
DYN1, KAR3
Anafaza timpurie
DYN1,
CIN8,KIP1
Mijlocul Anafazei
DYN1,
CIN8, KIP1
Anafaza tarzie
KIP3
Telofaza

Fig. 29— Motoare mitotice implicate în mitoză la *S.cerevisiae*. La intrarea în mitoză, proteina Kip3 este importantă în poziționarea nucleului la granița dintre celula-mamă și mugure. Poziționarea fusului de diviziune este influențată de proteinele Kip2, Kar3 și dinactina. La intrarea celulei în Anafază, proteina Cin8 este esențială pentru faza rapidă de elongare a fusului de diviziune, în vreme ce proteina Kip1 este importantă pentru faza lentă de elongare. Dineina participă la segregarea cromozomilor prin acțiunea sa asupra microtubulilor citoplasmatici. La sfârșitul mitozei, proteina Kip3 disociază microtubulii fusului de diviziune (după Heald și Walczak, 1999).

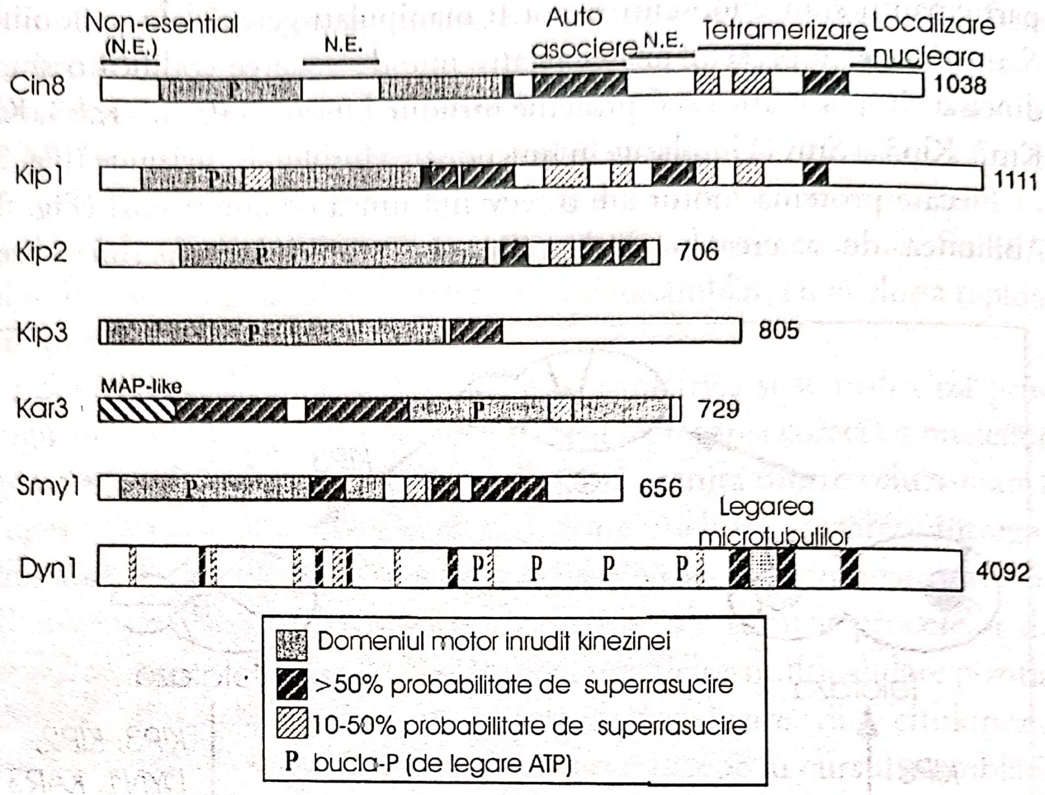

Non-esential (N.E.)
N.E.
Auto asociere
N.E.
Tetramerizare
Localizare nucleara
Cin8
1038
Kip1
P
1111
Kip2
P
706
Kip3
P
805
MAP-like
Kar3
P
729
Smy1
P
656
Legarea microtubulilor
Dyn1
P
P
P
P
4092
▩ Domeniul motor inrudit kinezinei
▰ >50% probabilitate de superrasucire
▨ 10-50% probabilitate de superrasucire
P bucla-P (de legare ATP)

Fig. 30 — Proteinele 'motor' asociate microtubulilor la *S.cerevisiae*. Toate cele 7 proteine motor asociate microtubulilor conțin domenii „motor", secvențe conservate de legare a ATP de tip buclă-P, regiuni necesare pentru oligomerizare și localizare nucleară. Regiunea NH_4-terminală a proteinei Kar3 poate lega microtubulii prin intermediul unui domeniu cu similitudine de secvență cu proteina MAP *(Microtubule-Associated Proteins)*. Dineina Din1 conține și ea un domeniu de legare a microtubulilor (după Hildebrandt, 2000).

experimentală a rolurilor jucate de fiecare motor mitotic. Proteinele motor Cin8, Kip1, Kip3 și Kar3 acționează în interiorul nucleului la asamblarea și elongarea fusului bipolar. Proteinele Kip2, Kip3 și Kar3 operează pe microtubulii citoplasmatici cu efect asupra poziționării fusului și nucleului în celulă. Proteina Smy1 este singura neimplicată în funcționarea fusului, fiind implicată în creșterea celulei polarizate și interacțiile genetice cu miozina Myo2.

Motoarele moleculare sunt implicate în trei activități fundamentale pentru funcționarea fusului: (1) motilitatea ATP-dependentă a cromozomilor de-a lungul microtubulilor, (2) atașarea microtubulilor prin legarea lor încrucișată sau la cromozomi și componentele celulare și (3) reglarea dinamicii microtubulilor, în special de către motoarele Kar3, Kip2 și Kip3.

Deoarece membrana nucleară rămâne intactă pe parcursul diviziunii mitotice, funcțiile proteinelor motor în nucleu (la asamblarea fusului de diviziune și la elongare) și în citoplasma (la poziționarea fusului și, în mai mică masură, la elongare) rămân distincte. Pentru motoarele Cin8 și Kip1 s-au detectat doar roluri nucleare, spre deosebire de Kip2 și dineina care funcționează citoplasmatic, iar Kar3 și Kip3 pe ambele fețe ale anvelopei nucleare.

Proteinele motor Cin8 și Kip1 sunt localizate la nivelul microtubulilor fusului de diviziune jucând un rol esențial în asamblarea fusului de diviziune și în segregarea cromozomilor. Cin8 și Kip1 sunt implicate în separarea polilor fusului și în elongarea fusului în Anafază, exercitând o acțiune antagonistă Kar3. Aceste proteine aparțin subfamiliei BimC de proteine înrudite cu kinezina, ai carei reprezentanți s-au identificat la toate eucariotele. Cin8 și Kip1 au o mărime (960-1100 aminoacizi) și o organizare structurală similară, o similitudine extrem de mare a domeniului 'motor' și funcții similare în asamblarea fusului de diviziune, cu rol esențial în reproducerea celulară. Coada carboxi-terminală a majorității motoarelor BimC este esențială pentru localizarea nucleară.

Cin8 și Kip1 se găsesc pe microtubuli localizați între polii fusului de diviziune, prezentând o activitate motorie direcționată de capătul (+) al microtubulilor, și formează tetrameri bipolari. Acest fapt sugerează că motoarele Cin8 și Kip1 leagă încrucișat microtubuli anti-paraleli, în zona de mijloc a fusului, și determină alunecarea microtubulilor către poli opuși (Fig. 31).

Fusul bipolar asamblat în preanafază este o structură metastabilă, forța creată de Cin8 și Kip1, ce impinge polii fusului în exterior, fiind contrabalansată de forța creată de Kar3 ce trage polii în interior.

Proteina Kar3 are o localizare variată: în mitoză este prezentă la nivelul SPB, a nucleului și fusului de diviziune, iar în celulele împerecheate este prezentă la nivelul microtubulilor citoplasmatici și a SPB. Kar3 este caracterizată printr-un domeniu 'motor' caroboxi-terminal ce se leagă la microtubuli utilizând hidroliza ATP. În plus, Kar3 prezintă la capătul amino-terminal un domeniu secundar de legare a microtubulilor similar proteinelor MAP, regiune importantă pentru legarea încrucișată a microtubulilor, în virtutea abilității acestei proteine motor de a forma dimeri paraleli. Forța de tragere către interior a polilor fusului metafazic de către

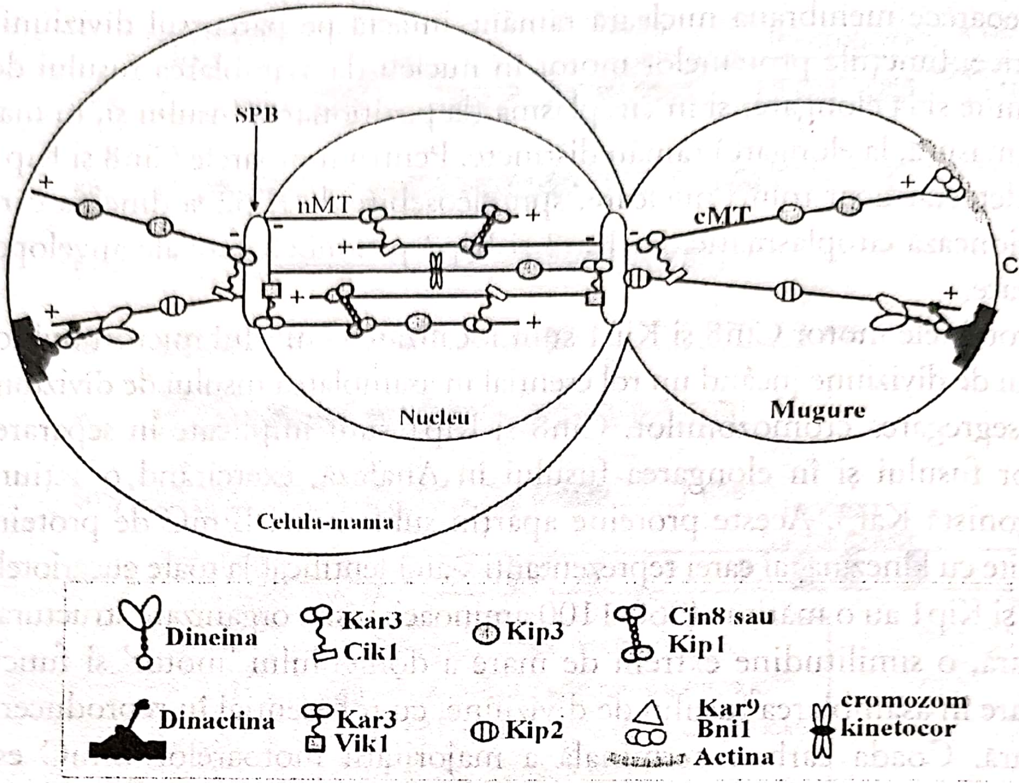


Fig. 31 — Proteinele „motor" implicate în mitoză la *S.cerevisiae.* Proteinele Cin8 și Kip1 formează un complex tetrameric bipolar ce încrucișează microtubulii nucleari (nMT) și se deplasează de-a lungul capetelor pozitive (+). Efectul acțiunii tetramerului Cin8/Kip1 este de a împinge și separa corpii bipolari (SPB). Kar3 participă în două complexe distincte. Complexul Kar3/Vik1 are doar rol nuclear și generează forța ce se opune acțiunii complexului Cin8-Kip1, ce atrage polii fusului. Complexul Kar3/Cik1 acționează citoplasmatic la poziționarea fusului. Dineina și dinactina operează la nivelul cortexului celular într-o manieră ce include și proteinele Kip2. Kar9/Bni1 și actina se atașează și leagă capătul pozitiv (+) a unui microtubul citplasmatic (cMT) de cortexul mugurelui, permițând activitatea proteinei Kip3 și/sau a complexului Kar3/Cik1 (după Hildebrandt și Hoyt, 1999).

Kar3 este pusă pe seama abilității sale de depolimeriza microtubulii la capetele lor (-), complexul Kar3/Vik1 acționând la poli pentru a promova depolimerizarea ce atrage poliiă.

Kar3 se asociază cu Cik1 și Vik1, două subunități accesorii omologe dar funcțional distincte. Complexul Cik1/Kar3 are o localizare celulară total diferită de complexul Vik1/Kar3. Kar3 și Vk1 sunt interdependente pentru localizarea in cursul mitozei la SPB. Cik1 este responsabilă de localizarea Kar3 la microtubulii fusului nuclear. Ca și Kar3, Cik1 este necesară pentru migrarea nucleară în timpul kariogamiei (fuziunea nucleară din timpul împerecherii), proces mediat de microtubulii citoplasmatici. Kar3 și Cik1 sunt interdependente pentru localizarea la nivelul microtubulilor citoplasmatici din celulele împerecheate. Proteina Kip2 este localizată la nivelul polilor fusului de diviziune și a microtubulilor citoplasmatici, prin intermediul domeniului „motor" central. Aceasta nu este prezentă în interiorul nucleului și nici nu joacă vreun rol nuclear. Ea contribuie la poziționarea nucleului prin forța exercitată în celula-mamă, forță ce antagonizează forței exercitată de Kip3 și dineină.

Proteina Kip3 este localizată la nivelul microtubulilor citoplasmatici și ai fusului. În primele faze ale ciclului celular, Kip3 este prezentă pe microtubulii citoplasmatici. În mitoză, se concentrează de-a lungul fusului nuclear, rămânând prezentă și în citoplasmă sub formă de spoturi punctiforme, ca și pe microtubuli. În Anafaza târzie este prezentă la zona centrală a fusului de diviziune, poziționând fusul de diviziune la granița celulă-mamă-mugure.

Dineina Dyn1 și dinactina (actina non-conventională) – dineina citoplasmatica și dinactina asociată funcțional sunt complexe multisubunitare mari, implicate în numeroase procese de motilitate în celula eucariotă. Dyn1 este o polipeptidă de 471kdal ce conține o regiune centrală înalt conservată, cu 4 situsuri de legarea ATP (bucle P), urmată de un situs de legare la microtubuli. Ea este localizată la nivelul cortexului celular, în concordanță cu rolul dineinei în poziționarea fusului de diviziune și cu inserția fusului de diviziune în mugure, în cursul Anafazei. La nivelul cortexului celular, Dyn1 se poate lega prin capătul (-) la capătul (+) al unui microtubul citoplasmatic exercitând forța care va împinga SBP atașat la capătul (-) al microtubulului către periferia celulei.

Dacă la celulele animale s-au identificat ~10 subunități polipetidice pentru complexul dinactina, până în prezent la *S.cerevisiae* s-au identificat doar trei componente pentru dinactina: Arp1 (centractina), Jnm1 (dinamitina) și Nip100. În plus, Cap1 și Cap2 sunt omologii pentru drojdii ai proteinelor α și β, proteine cu rol de 'bonetare' (*capping)* a filamentelor de actină, ce reprezintă componentele dinactinei în celulele animale.

Localizarea citoplasmatică a dineinei și activitatea țintită asupra fusului de diviziune sunt dependente de intercațiile dineinei cu complexul dinactină, care servește ca proteină *linker* între diferitele proteine "motor" de la nivelul fusului de diviziune.

23. STABILIREA COEZIUNII CROMATIDELOR-SURORI ÎN CURSUL MITOZEI LA *S.CEREVISIAE*

Pentru segregarea corectă a cromatidelor-surori, celulele eucariote și-au dezvoltat trei structuri: (1) fusul de diviziune - mașinărie complexă de microtubuli -, (2) centromera (CEN) - locus specific al cromatidei ce organizează asamblarea kinetocorului (complexul de legare a microtubulilor) -, și (3) coeziunea cromatidelor-surori - legarea încrucișată între cromatidele pereche- ce se formează în cursul replicării și persistă până în Anafază. Coeziunea proximală la CEN orientează kinetocorii-fii, astfel încât aceștia tind să se atașeze la microtubulii polilor opuși (Fig. 32).

În vreme ce dinamica microtubulilor acționează pentru împingerea kinetocorilor la poli opuși, coeziunea dintre cromatidele replicate se opune acestei forțe (Fig. 33).

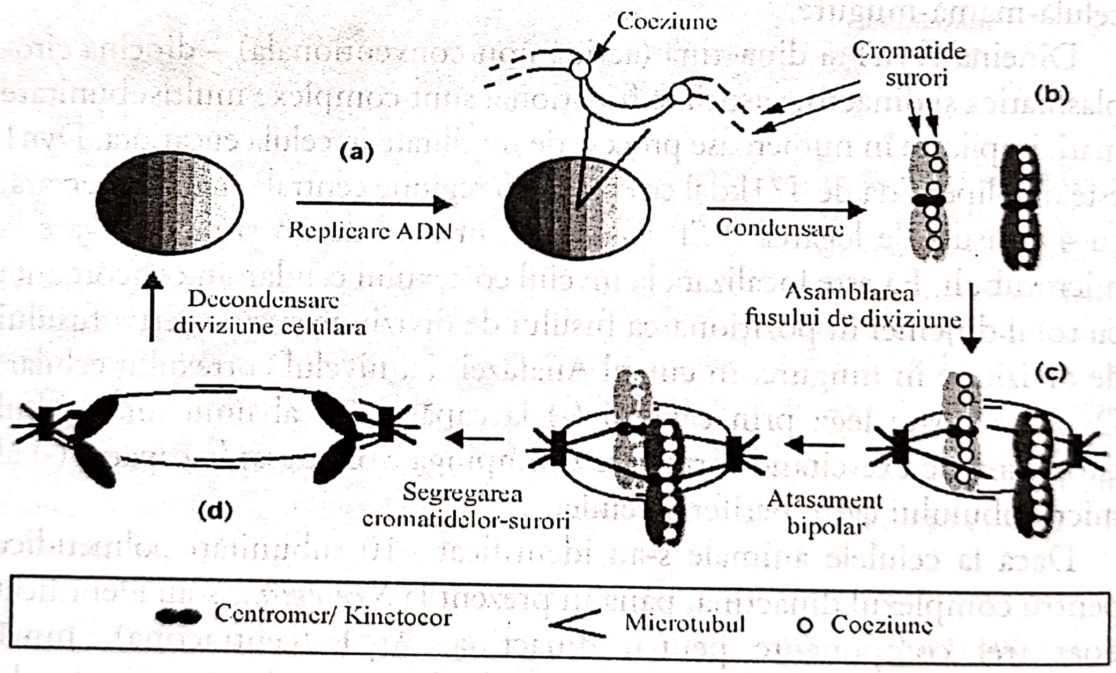

Coeziune
Cromatide surori
(b)
(a)
Replicare ADN
Condensare
Decondensare diviziune celulara
Asamblarea fusului de diviziune
(c)
(d)
Segregarea cromatidelor-surori
Atasament bipolar
Centromer/ Kinetocor
Microtubul
Coeziune

Fig. 32 — Coeziunea cromatidelor-surori. (a) Cromozomii sunt replicați în vederea formării celor două cromatide-surori. Coeziunea are loc concomitent cu replicarea, în vecinătatea CEN și de-a lungul brațelor cromatidelor. (b) Cromatidele-surori condensează și se formează fusul de diviziune. (c) Coeziunea dintre cromatidele-surori constrânge orientarea spațială a centromerului/kinetocorului astfel încât aceștia facilitează atașarea la microtubulii de la poli opuși. (d) La intrarea în Anafază, coeziunea dispare iar cromatidele-surori segregă (după Koshland și Guacci, 2000).

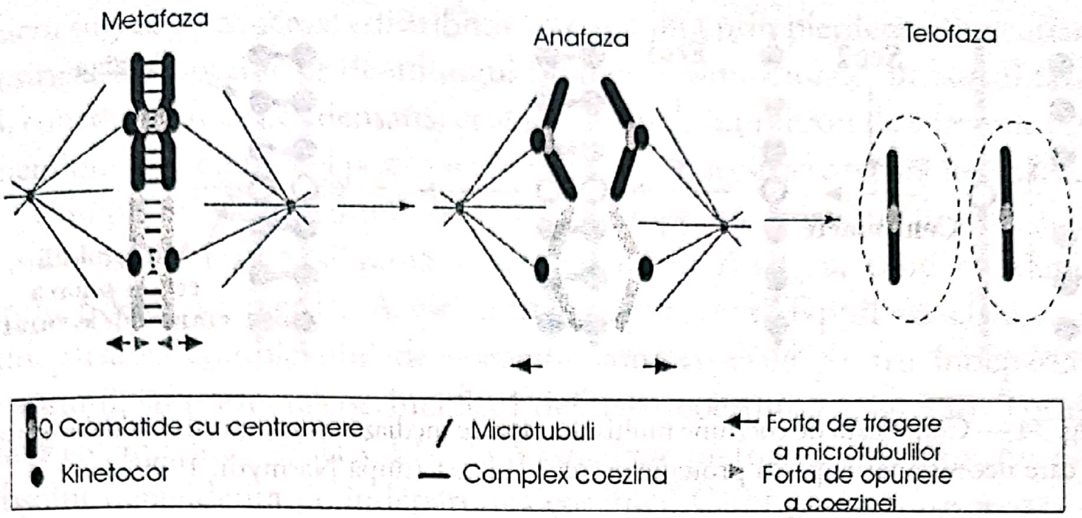


Fig. 33 — Mecanica cromozomilor în cursul mitozei. În mitoză, cromozomii suferă o serie de comportamente dinamice ce partiționează egal ADN-ul replicat în cele două celule-fiice. Cromatidele-surori replicate stabilesc coeziunea de-a lungul întregii lungimi concomitent cu replicarea ADN, în faza S, iar kinetocorii sunt asamblați la CEN fiecărei cromatide replicate. În Metafază, cromozomii condensați sunt atasați la microtubulii fusului de diviziune, prin intermediul kinetocorilor-perechi, iar cromozomii se aliniază în placa ecuatorială a celulei. Forțele exercitate de microtubuli imping cromozomii la cei doi poli opuși. Această forță este contracarată de forțele exercitate de coezinele atașate cromatidelor-surori. În Anafază, coeziunea dintre cromatide se pierde simultan de-a lungul fiecărui cromozom, pierderea acestei atașări permitând forțelor de impingere a microtubulilor kinetorului să direcționeze cromatidele-surori la poli opuși. Odată ce cromozomii au segregat, nucleii–fii se individualizează în jurul fiecărui set de cromozomi (după Dej și Weaver, 2000).

La drojdii, studiile biochimice și genetice au demonstrat apariția în cursul fazei **S** mitotice a unui complex proteinic de coeziune a cromatindelor-surori. La *S.cerevisiae,* acest complex este alcătuit dintr-o subunitate de coezină Scc1/Mcd1 (Rad21 la *S.pombe*) (Fig. 34). Proteina Scc1 este sintetizată în faza **G1** și se leagă la cromozomi în faza **S** și **G2**. La aceasta se adaugă proteinele non-coezine Smc1, Scc3 și Smc3, proteinele Smc făcând parte din familia de proteine SMC, înalt conservate la procariote și eucariote și care au numeroase funcții, inclusiv în condensarea cromozomilor.

CEN active de la *S.cerevisiae* recrutează o cantitate mare de coezine care se asociază cu cromatina pe o distanță de câteva kpb de fiecare parte a CEN.

Complexul de coeziune este disociat prin clivarea coezinei Scc1 de către proteaza dependentă de separina/Esp1, eliberată prin degradarea mediată

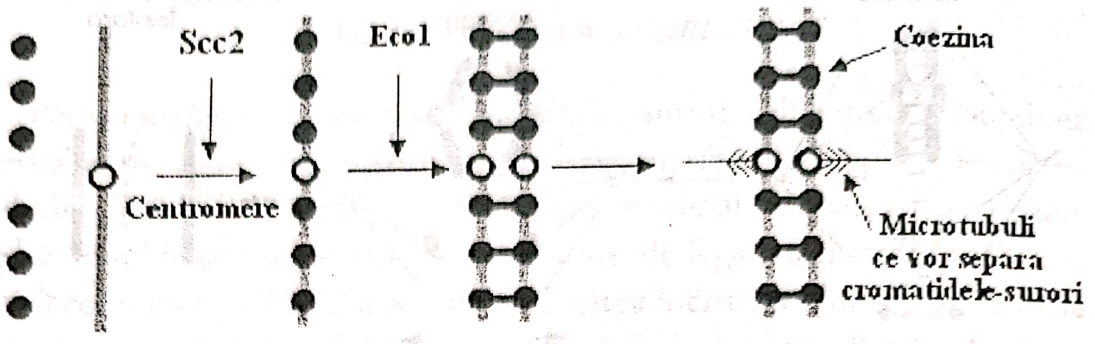


Fig. 34 — Complexul de coeziune multisubunitar ce mediază coeziunea cromatidelor-surori și care necesită participarea proteinelor Scc2 și Eco1 (după Nasmyth, 1999).

de ubiquitină a securinei Pds1. Deci, clivajul Scc1/Mcd1 este evenimentul cheie în eliberarea coeziunii dintre cromatidele-surori la *S.cerevisiae*. Eliberarea coezinei Scc1 de la CEN este corelată cu momentul separării CEN.

Coeziunea cromatidelor-surori se stabilește în cursul fazei **S** și se inițiază la nivelul CEN, cu participarea coezinei Scc1 și a proteinelor non-coezine. Coezina Scc1 trebuie să fie prezentă în cursul replicării ADN pentru a media atașarea cromatidelor replicate. Situsurile de legare pentru coezinele Scc1 sunt identificate de-a lungul brațelor cromozomale și în proximitatea CEN. Legarea în proximitatea CEN este mediată de două elemente ADN centromerice scurte, implicate și în asamblarea kinetocorului. Acest situs centromeric promovează legarea complexelor multiple de coezină, de-a lungul a câtorva kpb de cromatină, ce flanchează CEN, prin interacția cooperantă a subunităților de coezină. Situsurile de legare a coezinelor la nivelul brațelor sunt regiuni de ~200pb dispuse la intervale de ~10kpb.

Proteinele non-coezine sunt necesare stabilirii coeziunii, dar nu și pentru menținerea ei în faza **G2** sau în faza **M** timpurie. De exemplu, Scc2 și Scc4 sunt necesare încărcării complexului de coeziune în cromatidele replicate, iar Eco1 este necesară stabilirii coeziunii funcționale dintre cromatide. În plus, secvențele CEN de la *S.cerevisiae* sunt capabile să direcționeze coeziunea la secvențele adiacente non-centromerice. De exemplu, Scc1 și Smc1 sunt distribuite la ~20 situsuri primare bogate în AT, de-a lungul cromozomului, cu o cantitate mare de proteine localizată într-un domeniu din jurul CEN. Acest model de distribuție a coezinelor este prezent în celulele blocate cu hidroxi-uree în cursul tranziției G2-M și mai ales în faza S timpurie. Acest lucru sugerează că această distribuție este stabilită prin pierderea diferențiată a situsurilor coezinelor de-a lungul brațelor cromozomale, în cursul fazei S, concomitent cu condensarea cromozomilor. Complexul de coeziune este menținut în acest model pe cromatide până când acestea se separă în Anafază.

Complexul de coeziune se asamblează pe cromozomi, devine activ funcțional în faza S și rămâne activ până în Anafază, când coeziunea cromatidelor se pierde. Acest model sugerează și faptul că clivarea și îndepărtarea complexului de coeziune sunt cruciale pentru îndepărtare coeziunii, iar prezenta coezinei Scc1 definește coeziunea (Fig. 35.). Totuși, date recente arată că la CEN de *S.cerevisiae* pierderea coeziunii nu este absolut dependentă de îndepărtarea coezinei, CEN putându-se separa ca răspuns la forțele de împingere ale microtubulilor, în ciuda prezenței coezinei active. Mai mult, ADN-ul centromerelor se separă înainte de Anafază, coeziunea brațelor fiind responsabilă de opoziția forțelor de împingere ale microtubulilor până în Anafază.

În ceea ce privește dinamica separării cromozomilor la nivelul CEN, datele au arătat că separarea centromer-specifică a cromatidelor-surori este tranzitorie și dinamică: CEN se separă și se reasociază de câteva ori în perioada premergătoare separării din Anafază. Această separare tranzitorie are loc la situsuri plasate la ~38kpb depărtare de CEN. Separarea este independentă de proteoliza coezinei Scc1, dar dependentă de atașarea kinetocorilor-perechi la microtubulii fusului de diviziune funcțional.

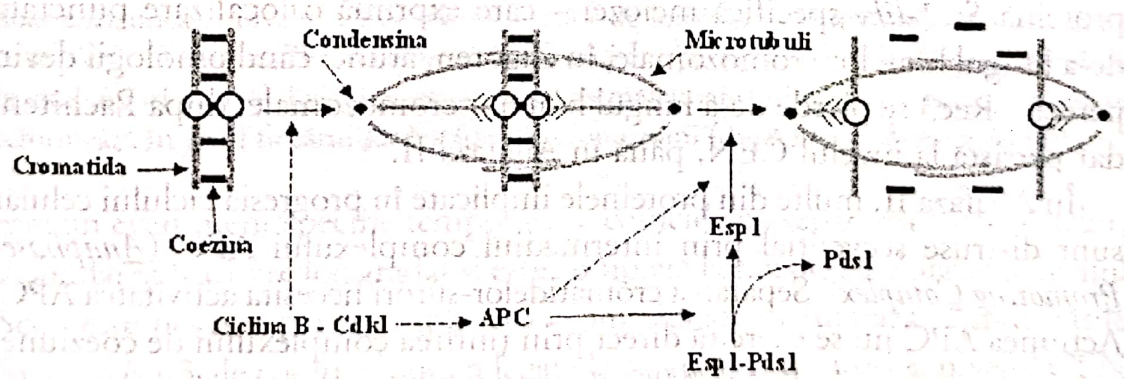


Fig. 35 — Separarea cromatidelor-surori la *S.cerevisiae* este indusă de activitatea separinei Esp1, ce determină disocierea Scc1 de pe cromozomi. Activitatea Esp1 este inhibată prin cuplarea cu Pds1, îndepărtată prin hidroliza indusă de APC activată de către ciclina B-Cdk1 (după Nasmyth, 1999).

La drojdii, aceleași secvențe CEN sunt necesare pentru asamblarea kinetocorului și legarea coezinei. Spre deosebire de drojdii, la eucariotele superioare, coeziunea CEN este controlată de un CEN funcțional și e separată de formarea kinetocorului ce are loc la un situs vecin.

Separarea cromatidelor-surori, prin pierderea coeziunii la nivelul CEN, are loc înainte de Anafază, dar CEN se reasociază și disociază de câteva ori în perioada preanafazică. Se pare că coeziunea de-a lungul brațelor este necesară pentru a preveni pierderea completă a coeziunii.

24. COEZIUNEA CROMATIDELOR ÎN MEIOZĂ

Dinamica și segregarea cromozomilor sunt diferite în meioză și mitoză, pierderea coeziunii cromatidelor-surori în meioză fiind un proces în două etape, separate prin coeziunea CEN: în Anafază I, cromatidele-surori se separă de-a lungul brațelor, permițând separarea omologilor la polii opuși ai fusului (diviziunea reducțională). Menținerea coeziunii în meioza I previne segregarea greșită a cromatidelor-surori. În Anafaza II cromatidele-surori se separă, coeziunea la nivelul CEN fiecărui cromozom fiind distrusă (diviziune ecvațională) (Fig. 36.).

Deși complexul de coeziune ce se asamblează în cursul replicării premeiotice este similar cu cel al mitozei, cele două procese diferă fundamental. La *S.cerevisiae* și *S.pombe* s-a identificat proteina Rec8 – proteina *Scc1-like* specifică meiozei – care exprimă o localizare punctată de-a lungul brațelor cromozomale, în Zigoten, atunci când omologii devin perechi. Rec3 se pierde de-a lungul brațelor cromozomale, după Pachiten, dar persistă la nivelul CEN, până în Anafaza II.

În Anafaza II, multe din proteinele implicate în progresia ciclului celular sunt distruse secvențial prin intermediul complexului APC (*Anaphase-Promoting Complex*). Separarea cromatidelor-surori necesită activitatea APC. Acțiunea APC nu se exercită direct prin țintirea complexului de coeziune, ci este un proces indirect: APC țintește un grup de proteine denumite securine (Pds1/Cut2), ce au o acțiune inhibitorie prin legarea separinei (Esp1/Cut1). Separina liberă este capabilă să medieze separarea cromatidelor-surori. La *S.cerevisiae*, acest eveniment coincide cu clivajul Scc1 la nivelul a două situsuri specifice de către Esp1. Deoarece clivajul

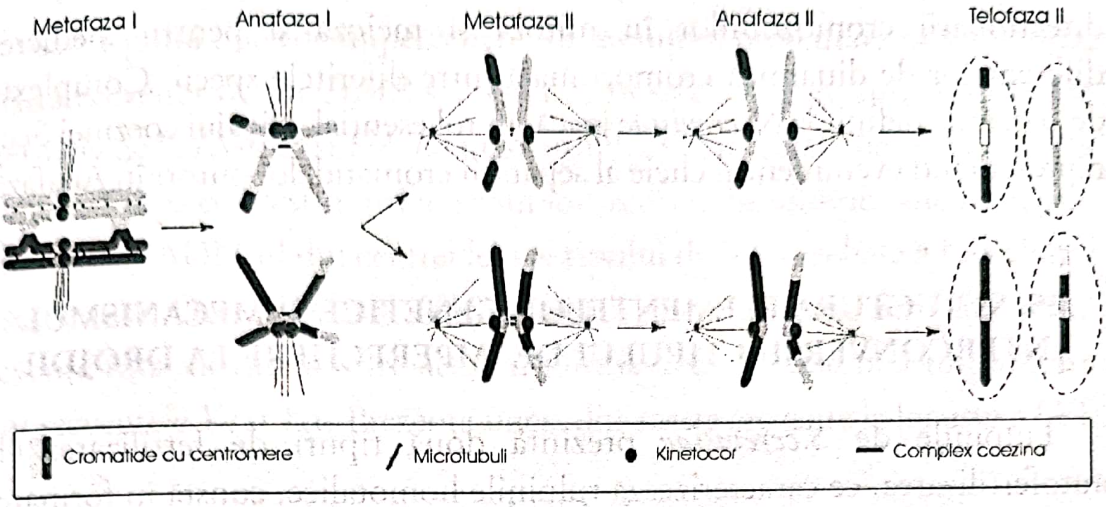


Fig. 36 — Mecanica cromozomilor în cursul meiozei. În cursul diviziunii meiotice, dinamica cromozomilor este alterată de segregarea cromozomilor replicați în patru nuclei–fii haploizi. Coeziunea cromatidelor-surori este stabilită de-a lungul cromozomilor în cursul fazei S premeiotice. Recombinarea genetică dintre cromozomii omologi are loc la cel puțin unul din situsurile fiecărui braț al cromozomilor omologi (chiasmata). Ca rezultat, coeziunea cromatidelor-surori menține alinierea paralelă a omologilor pereche, formând un bivalent stabil. Kinetocorii împerecheați se îndreaptă către același pol și se atașează microtubulilor fusului de diviziune, dar kinetocori de pe omologi se atașează la microtubulii ce emerg de la polii opuși ai fusului, permitând alinierea bivalenților în placa ecuatorială a Metafazei I. Coeziunea cromatidelor rezistă forțelor microtubulilor de împingere a omologilor spre polii opuși. În Anafaza I, coeziunea cromatidelor se pierde de-a lungul brațelor cromozomale dar se menține la nivelul CEN. Ca rezultat, recombinarea are loc și cromozomii omologi sunt împinși la poli opuși (diviziunea reducțională). În Prometafaza II, kinetocorii-perechi sunt capabili să se atașeze microtubulilor emanați de poli opuși. În cursul metafazei II, doar coeziunea la nivelul CEN rezistă forțelor de împingere a microtubulilor, coeziune ce se pierde în Anafaza II când cromatidele-surori se separă și sunt deplasate de microtubuli la poli opuși într-o diviziune ecvațională asemănătoare mitozei. La final, nucleii se reformează în jurul fiecărui set haploid de cromozomi (după Dej și Weaver, 2000).

este un eveniment specific temporar, ce coincide cu separarea cromatidelor, degradarea Scc1 are loc gradat și este completă la sfarșitul Telofazei. Clivajul Scc1 este necesar pentru separarea cromatidelor în Anafază. Subunitățile Smc1 și Sm3 ale coezinei rămân legate la cromatidele-surori la nivelul CEN și a situsurilor brațelor până în Telofază, chiar dacă Scc1 este clivată și îndepărtată de pe brațele cromozomale.

În concluzie, există deosebiri fundamentale în natura coeziunii cromatidelor la nivelul CEN și a brațelor cromozomilor, deosebire necesare direcționării cromozomilor în mitoză și meioză și pentru medierea diferențelor de dinamică cromozomală între diferitele specii. Complexul de coeziune definit la *S.cerevisiae* joacă un rol esențial, clivajul coezinei Scc1 reprezentând evenimentul cheie al separării cromatidelor-surori în Anafază.

25. STRUCTURA ELEMENTELOR GENETICE ȘI MECANISMUL INTERCONVERSIEI TIPULUI DE ÎMPERECHERE LA DROJDII

Tulpinile de *S.cerevisiae* prezintă două tipuri de fertilizare: (1) autofertilizarea, ce caracterizează tulpinile homotalice, constă în formarea de diploizi pornind de la o cultură ce conține un singur tip de spori (monosporală), și (2) fertilizarea încrucișată, caracteristică tulpinilor heterotalice, în cursul căreia se formează diploizi prin împerecherea celulelor cu tip opus de împerechere.

Fiecare celulă haploidă de *S.cerevisiae* prezintă unul din cele două tipuri de împerechere posibile, respectiv tipul de împerechere **a** sau **α.** Două celule haploide cu tip opus de împerechere pot fuziona dând naștere unui heterozigot **a/ α.** (Fig. 37.).

În fiecare generație, o celulă normală haploidă își poate comuta tipul de împerechere printr-un proces de *conversie genică specifică*. Interconversia genică specifică reprezintă, alături de disjuncția cromozomilor în cursul meiozei și *crossing-over*, una din principalele modalități de recombinare genetică ce au loc în lumea eucariotă.

La *S.cerevisiae*, structurile genetice direct implicate în acest fenomen sunt reprezentate de trei loci genetici plasați pe cromozomul III (Fig. 38.). Locusul central este denumit locus *MAT* (*Mating Type*). Acesta este transcris activ într-un ARNm, iar proteina corespunzătoare reglează activitatea genelor plasate distal față de locusul MAT. Trei gene nelinkate codifică proteinele ce dau naștere fenotipului celular **a** sau **α**. Două copii adiționale silențiate (netranscrise) ale informației genetice prezente în locusul MAT sunt plasate la nivelul locilor *HML* (*Homothalic MAT Left* – copia homotalică de la stânga locusului MAT) și *HMR* (*Homothalic MAT Right* - copia homotalică de la dreapta locusului MAT).

În funcție de tulpina de drojdie, locusul silențiat *HML* conține secvențele necesare tipului **a** sau **α** de împerechere, iar locusul *HMR* conține secvențele necesare tipului opus de împerechere. În exemplul prezentat, locusul *HML* poartă secvența α, iar *HMR* secvența *a*. Aceste secvențe sunt transferate alternativ de la *HMLα* și *HMRa* în locusul MAT, în cursul fiecărei generații celulare. După ce acest transfer a avut loc, secvențele anterior silențiate pot fi transcrise. ADN-ul din cei trei loci ai tipului de împerechere a fost clonat și secvențiat. Deși *HMLα* și *HMRa* conțin unele secvențe similare, există secvențe total distincte între aceștia. Dintre acestea, cele mai importante sunt secvențele *Ya* și *Yα*. Prezența uneia din aceste secvențe la locusul MAT

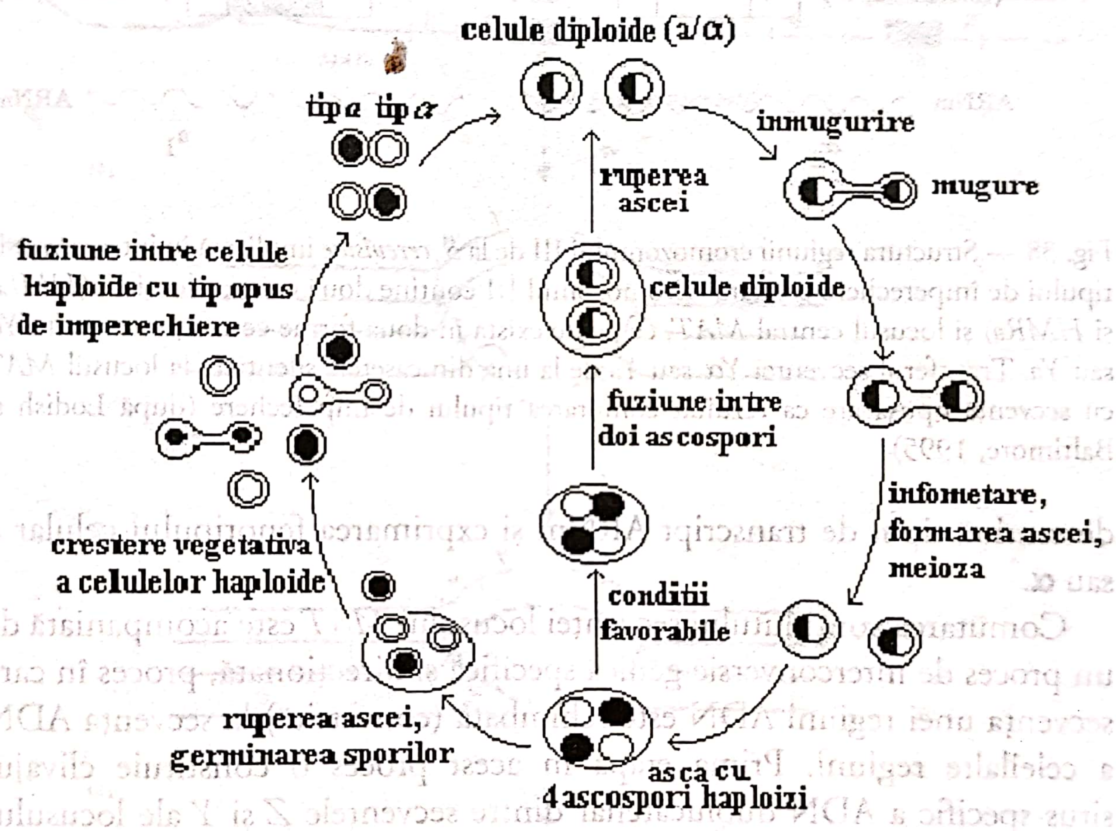

celule diploide (a/α)
tip a tip α
inmugurire
ruperea ascei
mugure
fuziune intre celule haploide cu tip opus de imperechiere
celule diploide
fuziune intre doi ascospori
infometare, formarea ascei, meioza
crestere vegetativa a celulelor haploide
conditii favorabile
ruperea ascei, germinarea sporilor
asca cu 4 ascospori haploizi

Fig. 37 — Ciclul de viață la *S. cerevisiae*. O celulă haploidă cu tip de împerechere α poate fuziona numai cu o altă celulă haploidă cu tip opus de împerechere (tip **a**), cu formarea unei celule diploide α/**a**, care se multiplică vegetativ prin inmugurire. În condițiile epuizării substanțelor nutritive din mediu, celulele diploide intră în diviziune meiotică, formând asce cu ascospori haploizi. Prin ruperea peretelui ascei se eliberează ascospori cu unul din cele două tipuri de împerechere. În prezența nutrienților, sporii haploizi germinează la celule haploide care, de asemenea, se pot multiplica vegetativ prin înmugurire (după Lodish și Baltimore, 1995).

Cromosomul III

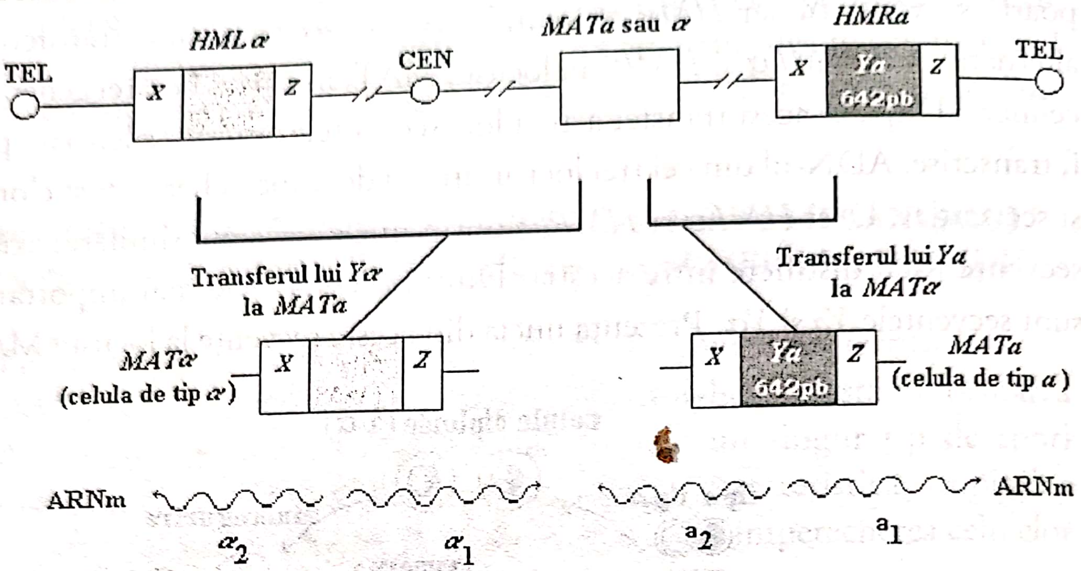

HML α
TEL
X
Z
CEN
MAT a sau α
HMRa
X
Ya
642pb
Z
TEL
Transferul lui Yα
la MAT a
Transferul lui Ya
la MAT α
MAT α
(celula de tip α)
X
Z
X
Ya
642pb
Z
MAT a
(celula de tip a)
ARNm
α2
α1
a2
a1
ARNm

Fig. 38 — Structura regiunii cromozomului III de la *S. cerevisiae* implicată în interconversia tipului de împerechere celulară. Cromozomul III conține două casete silențiate (*HMLα* și *HMRa*) și locusul central *MAT*, ce poate exista în două forme ce conțin secvența *Yα* sau *Ya*. Transferul secvenței *Yα* sau *Ya* de la una din casetele silențiate la locusul *MAT* cu secvență opusă are ca rezultat comutarea tipului de împerechere (după Lodish și Baltimore, 1995).

determină tipul de transcript ARNm și exprimarea fenotipului celular **a** sau **α**.

Comutarea conținutului secvenței locusului *MAT* este acompaniată de un proces de interconversie genică specifică și direcționată, proces în care secvența unei regiuni ADN este schimbată (convertită) la secvența ADN a celeilalte regiuni. Prima etapă în acest proces o constituie clivajul situs-specific a ADN dublucatenar dintre secvențele *Z* și *Y* ale locusului *MAT* (1). Acest proces este realizat de endonucleaza HO (*Y/Z)* codificată de gena *ho* plasată pe cromozomul IV. După clivaj, secvența *Ya* rezidentă este degradată astfel că apare o breșa de aprox. 600 pb la nivelul *MAT* care trebuie reparată (2). În etapa urmatoare, catenele *MAT* se împerechează cu catenele *HMLα* complementare. Capetele breșei apărute invadează locusul *HMLα*. Sinteza ADN începe de la capetele libere 3'OH⁻ ale catenelor *MAT*, copiindu-se secvența *Yα* la locusul *HMLα* (3). Schimbul de catene între regiunea nou copiată a locusului *HMLα* și porțiunea rămasă a locusului *MAT* conduce la regenerarea acestuia din urma cu secvența *Yα* ce a substituit secvența originală *Ya* (4). O dată *HMLα* refăcut, poate comuta din nou în generația ulterioară. În cursul următoarei diviziuni celulare, *MATα* este convertit la *MATa*, printr-un proces identic, dar care va implica locusul *HMRa* (Fig. 39).

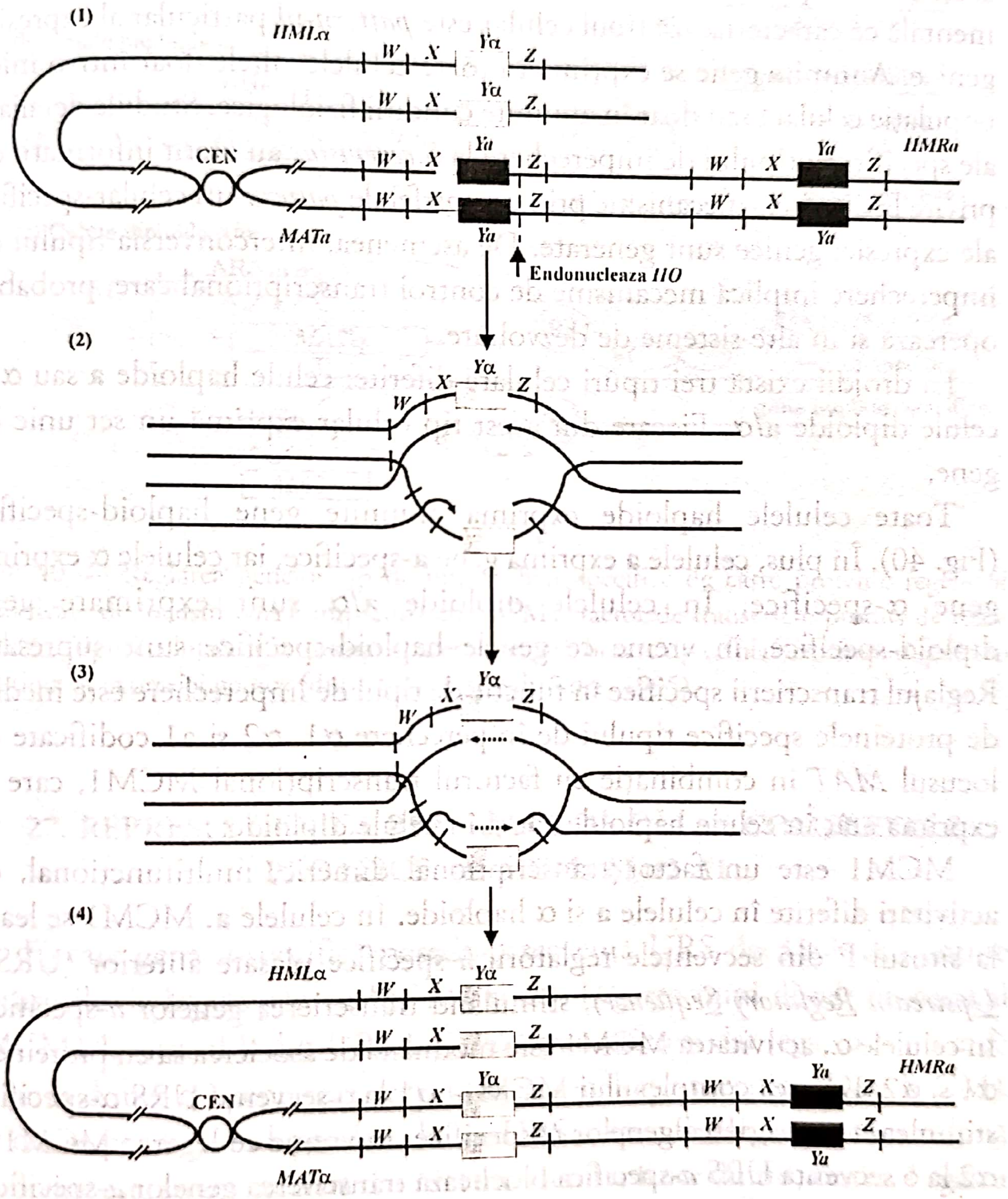

(1)
HMLα
W
X
Yα
Z
CEN
Ya
HMRa
MATa
Endonucleaza HO
(2)
(3)
(4)
MATα

Fig. 39 — Etapele comutării tipului de împerechere prin interconversie genică la *S.cerevisiae* (după Lodish și Baltimore, 1995).

26. REGLAJUL GENETIC AL INTERCONVERSIEI TIPULUI DE ÎMPERECHERE (REGLAJUL EXPRESIEI GENELOR SPECIFICE TIPULUI DE ÎMPERECHERE)

Organismele multicelulare conțin numeroase tipuri celulare distincte. Deși aceste tipuri celulare sunt morfologic distincte, proprietatea fundamentală ce caracterizează tipul celular este *pattern*-ul particular al expresiei genice. Anumite gene se exprimă în toate celulele, altele doar într-o mică populație celulară sau doar în anumite condiții fiziologice. Studiile detaliate ale specificării tipului de împerechere la *S.cerevisiae* au oferit informații cu privire la diferitele mecanisme prin care astfel de *pattern*-uri celular-specifice ale expresiei genice sunt generate. De asemenea, interconversia tipului de împerechere implică mecanisme de control transcripțional care, probabil, operează și în alte sisteme de dezvoltare.

La drojdii există trei tipuri celulare diferite: celule haploide **a** sau α și celule diploide **a/α.** Fiecare din acest tip celular exprimă un set unic de gene.

Toate celulele haploide exprimă anumite gene haploid-specifice (Fig. 40). În plus, celulele **a** exprimă gene **a**-specifice, iar celulele α exprimă gene α-specifice. În celulele diploide **a/α** sunt exprimate gene diploid-specifice, în vreme ce genele haploid-specifice sunt supresate. Reglajul transcrierii specifice în funcție de tipul de împerechere este mediat de proteinele specifice tipului de împerechere α1, α2 și a1 codificate de locusul *MAT* în combinație cu factorul transcripțional MCM1, care se exprimă atât în celule haploide cât și în celule diploide.

MCM1 este un factor transcripțional dimeric, multifuncțional, cu activități diferite în celulele **a** și α haploide. În celulele **a**, MCM1 se leagă la situsul P din secvențele reglatorii *a*-specifice plasate anterior (URS - *Upstream Reglatory Sequence*), stimulând transcrierea genelor *a*-specifice. În celulele α, activitatea MCM1 este modulată de asocierea sa cu proteinele α1 și α2. Legarea complexului MCM1- α1 la o secvență URS *α*-specifică stimulează transcrierea genelor *α*-specifice, în vreme ce legarea MCM1 și α2 la o secvență URS *a*-specifică blochează transcrierea genelor *a*-specifice. În plus, asocierea MCM1 cu proteina STE12 activată de feromoni permite transcrierea numai a anumitor gene *a*- și *α*-specifice.

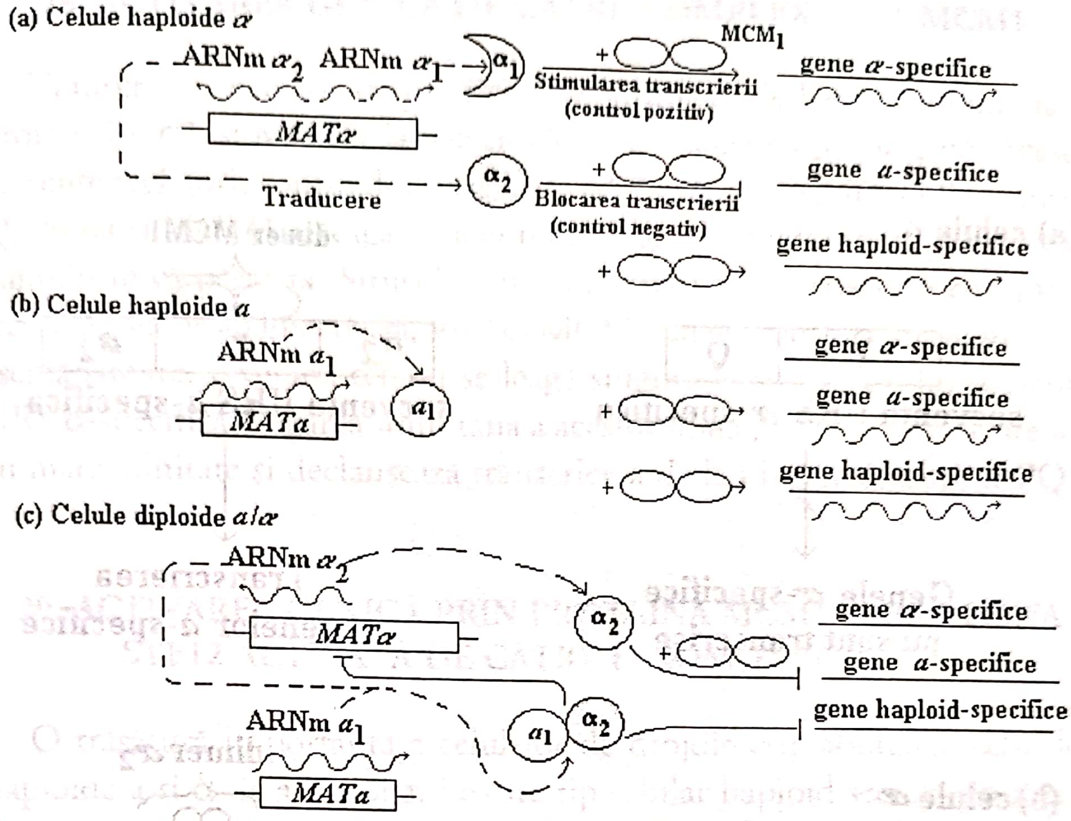

(a) Celule haploide *α*
ARNm α_2
ARNm α_1
α_1
MCM_1
Stimularea transcrierii
(control pozitiv)
gene *α*-specifice
MATα
α_2
Traducere
Blocarea transcrierii
(control negativ)
gene *a*-specifice
gene haploid-specifice
(b) Celule haploide *a*
ARNm a_1
MATa
a_1
gene *α*-specifice
gene *a*-specifice
gene haploid-specifice
(c) Celule diploide *a*/*α*
ARNm α_2
MATα
α_2
gene *α*-specifice
gene *a*-specifice
gene haploid-specifice
ARNm a_1
a_1
α_2
MATa

Fig. 40 — Reglarea genelor tip de împerechere-specifice de către proteine reglatorii codificate de locusul *MAT* împreună cu MCM1, factor de transcriere produs de toate cele trei tipuri celulare. Ca rezultat al acestei reglări, fiecare tip celular exprimă un *pattern* distinct al expresiei genice (după Lodish și Baltimore, 1995).

27. REPRESIA GENICĂ REALIZATĂ DE CĂTRE COMPLEXELE PROTEICE α2-MCM1 ȘI α2-A1

Fiecare genă *a*-specifică posedă o secvență URS de 31pb ce conține situsurile de legare pentru MCM1 și α2. Legarea unui dimer funcțional MCM1 la situsul P din URS activează transcrierea, dar legarea simultană a unui dimer α2 represează exprimarea genelor *a*-specifice. Deși MCM1 și α2 se pot lega independent la un URS *a*-specific, legarea acestor două proteine este strâns corelată datorită interacțiilor fizice dintre acestea. Legarea corelată asigură represia transcrierii genelor *a*-specifice în celulele haploide α și diploide **a/α** (Fig. 41).

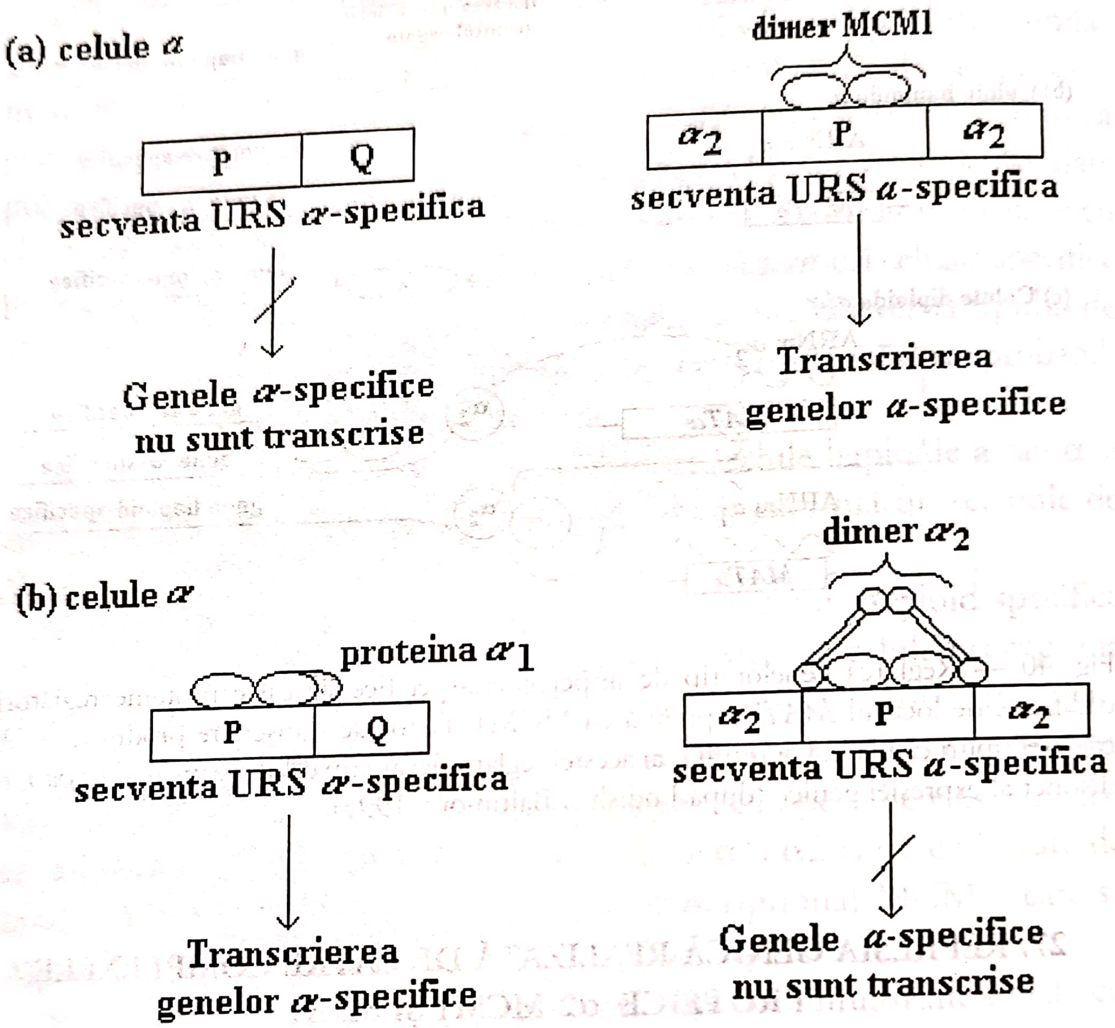

(a) celule α
dimer MCM1
P
Q
α2
P
α2
secventa URS α-specifica
secventa URS a-specifica
Genele α-specifice nu sunt transcrise
Transcrierea genelor a-specifice
dimer α2
(b) celule α
proteina α1
P
Q
α2
P
α2
secventa URS α-specifica
secventa URS a-specifica
Transcrierea genelor α-specifice
Genele a-specifice nu sunt transcrise

Fig. 41 — Proteina MCM1 se leagă sub formă dimerică la situsul P al secvențelor URS a- sau α-specifice. Secvențele consensus ale situsurilor P pentru genele a- și α-specifice diferă într-o oarecare măsură. (a) În celule a, dimerul MCM1 stimulează transcrierea genelor a-specifice. În absența proteinei α, MCM1 nu se poate atașa la situsul P din secvența URS α-specifică. (b) În celulele α, activitatea factorului de transcriere MCM1 este modificată prin asocierea sa cu proteine α1 sau α2. Complexul α1-MCM1 stimulează transcrierea genelor α-specifice, în vreme ce complexul α2-MCM1 blochează transcrierea genelor a-specifice. Complexul α2-MCM1 este prezent și în celulele diploide, în care prezintă același efect de blocare a transcrierii genelor a-specifice (după Lodish și Baltimore, 1995).

28. ACTIVAREA GENICĂ DE CĂTRE COMPLEXUL α1-MCM1

Transcrierea genelor α-specifice este stimulată de legarea simultană a proteinelor α1 și MCM1 la secvențele URS asociate acestor gene. Aceste secvențe reglatorii conțin două secvențe ADN adiacente, situsul P și situsul Q. Proteina MCM1 se leagă eficient numai dacă situsul P prezintă o secvență palindromică perfectă. Situsul P din secvența URS α-specifică conține o secvență palindrom imperfectă, astfel că MCM1 nu se poate lega. Într-o manieră asemănătoare, proteina α1 nu se leagă singură la situsul Q din secvența URS α-specifică. Legarea simultană a acestor două proteine, totuși, are loc cu mare afinitate și declanșează transcrierea de la nivelul situsurilor PQ.

29. ACTIVAREA GENICĂ PRIN PROTEINA MCM1 ȘI PROTEINA STE12 ACTIVATĂ DE CĂTRE FEROMONI (FIG. 42.)

O trăsătură importantă a celulelor de drojdie este abilitatea celulelor haploide **a** și α de a fuziona. Fiecare tip celular haploid secretă un factor de împerechere diferit (factor **a** sau factor α), polipeptide mici denumite ***feromoni,*** și exprimă un receptor de suprafață ce recunoaște feromonul secretat de celulele de tip opus. Legarea acestor factori de împerechere la receptorii corespunzători determină exprimarea unui set de gene implicate în mod direct în blocarea ciclului celular în faza **G1** și atașarea/fuziunea celulelor haploide, cu formarea de diploizi.

Studiile efectuate cu celule de drojdie mutante au elucidat mecanismele prin care feromonii **a** și α activează receptorii de suprafață, declanșând o cascadă de reacții biochimice care în final vor schimba expresia genică. Aceste studii au evidențiat o serie de similitudini surprinzătoare, existente între mecanismele prin care celuele de drojdie răspund la factorii de împerechere și mecanismele prin care eucariotele superioare răspund la diverși factori extracelulari ce stimulează creșterea și diferențierea.

Celulele haploide mutante la locusul *ste12* (*Sterile*) nu pot răspunde feromonilor și, prin urmare, nu se împerechează. Gena *ste12* codifică o proteina STE12 ce se leagă la o secvență ADN denumită PRE (*Pheromone-Responsive Element* - element de răspuns la feromon). Acest element este prezent în multe secvențe URS *a*- sau α-specifice. Legarea feromonului

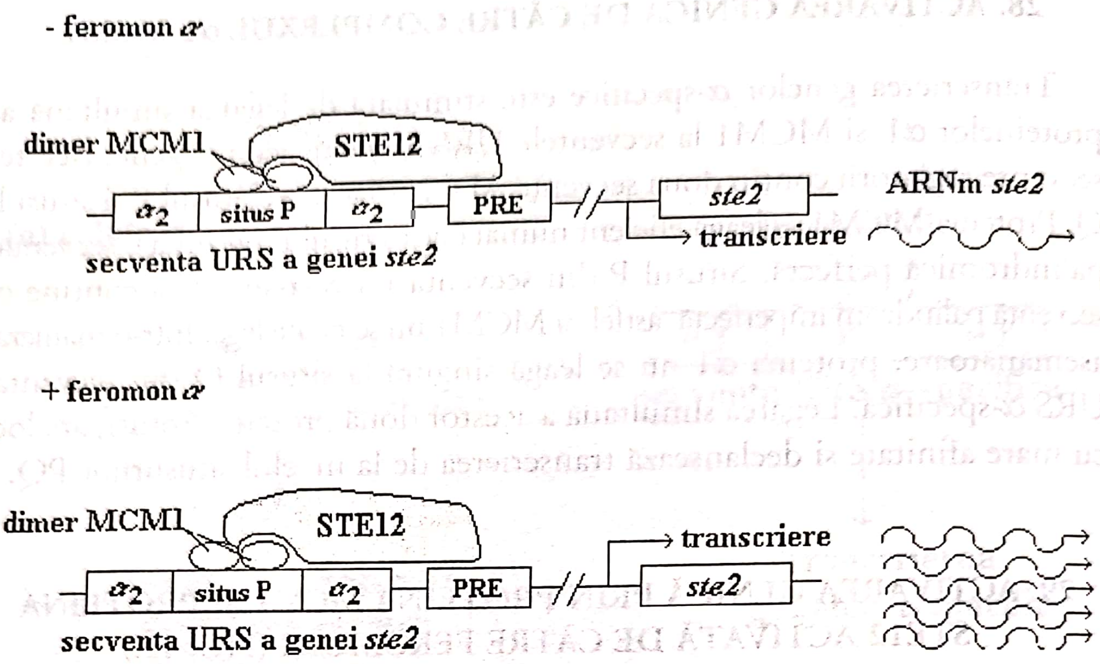

- feromon α
dimer MCM1
STE12
α2
situs P
α2
PRE
ste2
ARNm ste2
transcriere
secventa URS a genei ste2
+ feromon α
dimer MCM1
STE12
transcriere
α2
situs P
α2
PRE
ste2
secventa URS a genei ste2

Fig. 42 — Secvența URS a genei *ste2* conține un situs P de legare a dimerului proteinic MCM1 și un situs vecin PRE de legare a proteinei STE12. În prezența factorului de împerechere α, rata transcrierii genei *ste2*, genă a-specifică, crește semnificativ (după Lodish și Baltimore, 1995).

induce o cascadă de semnale, ce au ca efect fosforilarea diferitelor proteine, inclusiv proteina STE12. Această fosforilare rapidă este corelată cu o creștere a abilității proteinei STE12 de a stimula transcrierea.

Interacția proteinei STE12 cu ADN a fost studiată în mod special la nivelul secvenței URS ce controlează transcrierea genei *ste2*, o genă *a*-specifică ce codifică receptorul STE2 pentru feromonul α. Adiacent acestei secvențe URS se găsește elementul PRE, care leagă proteina STE12. Tratamentul cu feromon α/**a** celulei are ca efect creșterea ratei de transcriere a genei *ste2* într-un proces ce necesită proteina STE12. Cu alte cuvinte, reglarea indusă de feromoni receptorului α crește eficiența procesului de împerechere. S-a observat că proteina STE12 se leagă mult mai eficient la elementul PRE din secvența URS a genei *ste2* atunci când proteina MCM1 este atașată simultan la situsul P adiacent. În acest caz, proteina MCM1 funcționează ca un activator la nivelul unui alt URS prin interacțiune cu STE12, factor transcripțional a cărui activitate este modificată de semnale extracelulare.

30. SPECIFICITATEA CELULELOR HAPLOIDE

Locusul *ho* contine o genă haploid-specifică a cărei transcriere este represată în celulele diploide de drojdie. Represia este mediată de complexul heterodimeric α2 și a1, proteine codificate de *MATα* și *MATa*. Acest complex se leagă la situsuri multiple din interiorul secvențelor URS1(~600 pb) și URS2 (~750pb) – două secvențe adiacente plasate cu ~110pb înaintea locusului *ho*. La nivelul acestora se realizează reglajul transcripțional al locusului *ho*, ce codifică endonuclează HO care inițiază procesul de interconversie genică.

Controlul expresiei endonucleazei HO este exercitat și de alte proteine, precum proteinele Swi (*Switch*) 1, 2 și 3. Acestea, ca și Swi 4 - 6, sunt necesare conversiei tipului de împerechere.

Mecanismele moleculare prin care nivelele diferite de reglaj converg către locusul *ho*, controlându-i precis transcrierea, sunt necunoscute. Unele modele propun că legarea proteinei Swi5 la secvența URS1 promovează activitatea proteinelor Swi1, 2, și 3. Aceste proteine permit legarea factorului CCBF (Swi4/Swi6) la URS2. Odată Swi5 și CCBF legate la regiunea reglatorie *ho*, se inițiază exprimarea endonucleazei HO și comutarea tipului de împerechere în faza **G1** a ciclului celular.

31. SPECIFICITATEA CICLULUI CELULAR

Secvența URS2 (~750pb) conține 10 repetiții ale unei secvențe de 12 pb denumită *cell cycle box*, a cărei funcționare stimulează expresia endonucleazei HO în cursul fazei **G1** a ciclului celular. La nivelul acestei repeții se leagă complexul proteinic CCBF (*Cell-Cycle Box Factor*) ce conține proteinele Swi4 și Swi6 codificate de genele *swi4* și swi6. Analizele genetice au arătat că ambele proteine sunt necesare comutării tipului de împerechere. Aceste proteine sunt importante și în reglarea expresiei altor gene. Swi4 se leagă specific, în absența Swi6, la *cell cycle box*, fapt ce sugerează că Swi6 este necesară activării funcției CCBF și nu pentru abilitatea sa de legare situs-specific la ADN. Activitatea și/sau exprimarea factorului CCBF este indusă de kinaza Cdc28, o componentă centrală a mașinăriei ciclului celular, deosebit de activă în faza **G1** târzie.

32. SEMNALIZAREA PRIN FEROMONI LA *S.CEREVISIAE*

Abilitatea de a răspunde la semnale externe este o caracteristică ce se extinde de la organismele unicelulare până la organismele complexe multicelulare. Chiar și la nivelul unei singure celule, răspunsul la factorii externi presupune procesarea acestor semnale, un singur semnal putând produce un răspuns complex și coordonat.

Unul din cele mai studiate răspunsuri celulare la un semnal extracelular este reprezentat de activarea procesului de împerechere a celulelor haploide de *S.cerevisiae*. În acest sistem model, feromoni mici de natură polipeptidică, produși de celule aparținând unui tip de împerechere, sunt recunoscuți de celulele tipului de împerechere opus, această recunoaștere având o varietate de consecințe biologice: blocarea ciclului celular, modularea transcrierii și modificări ale morfologiei celulare. Răspunsul celulei haploide la stimulii externi este mediat de o cale de transducție a semnalului care folosește cele două module de semnalizare eucariote : (1) proteina G heterotrimeră, atașată la un receptor transmembranar, și (2) un set de 3 protein-kinaze activate secvențial, ce alcătuiesc cascada MAP-kinazică. La *S.cerevisiae*, legătura dintre aceste două module este realizată de kinaza Ste20 - membru al familiei kinazelor PAK activate de p21 (PAK – *p21-activated kinases*).

33. RECEPTORII ȘI PROTEINA G

Deși unele componente ale cascadei MAP-kinazice interferă cu alte căi de transducție a semnalelor, receptorii și subunitățile proteinei G sunt elemente implicate exclusiv în procesul de împerechere la drojdii (Fig. 43.). Calea de răspuns la împerechere este activată prin legarea unei molecule feromon la receptorul specific tipului celular: proteina Ste2, în cazul celulelor *MATa*, și proteina Ste3, în cazul celulelor *MATα*. Legarea ligandului determină modificarea proteinelor receptor prin ubiquitinizare și modificări conformaționale. Această legare stimulează activarea proteinei G cuplată cu receptorul.

Coada carboxi-terminală a receptorilor Ste (Ste2 și Ste3) este implicată în reglajul activității acestora. La Ste2, acest domeniu este situsul de ubiquitinizare necesar endocitozei propriu-zise și degradării vacuolare

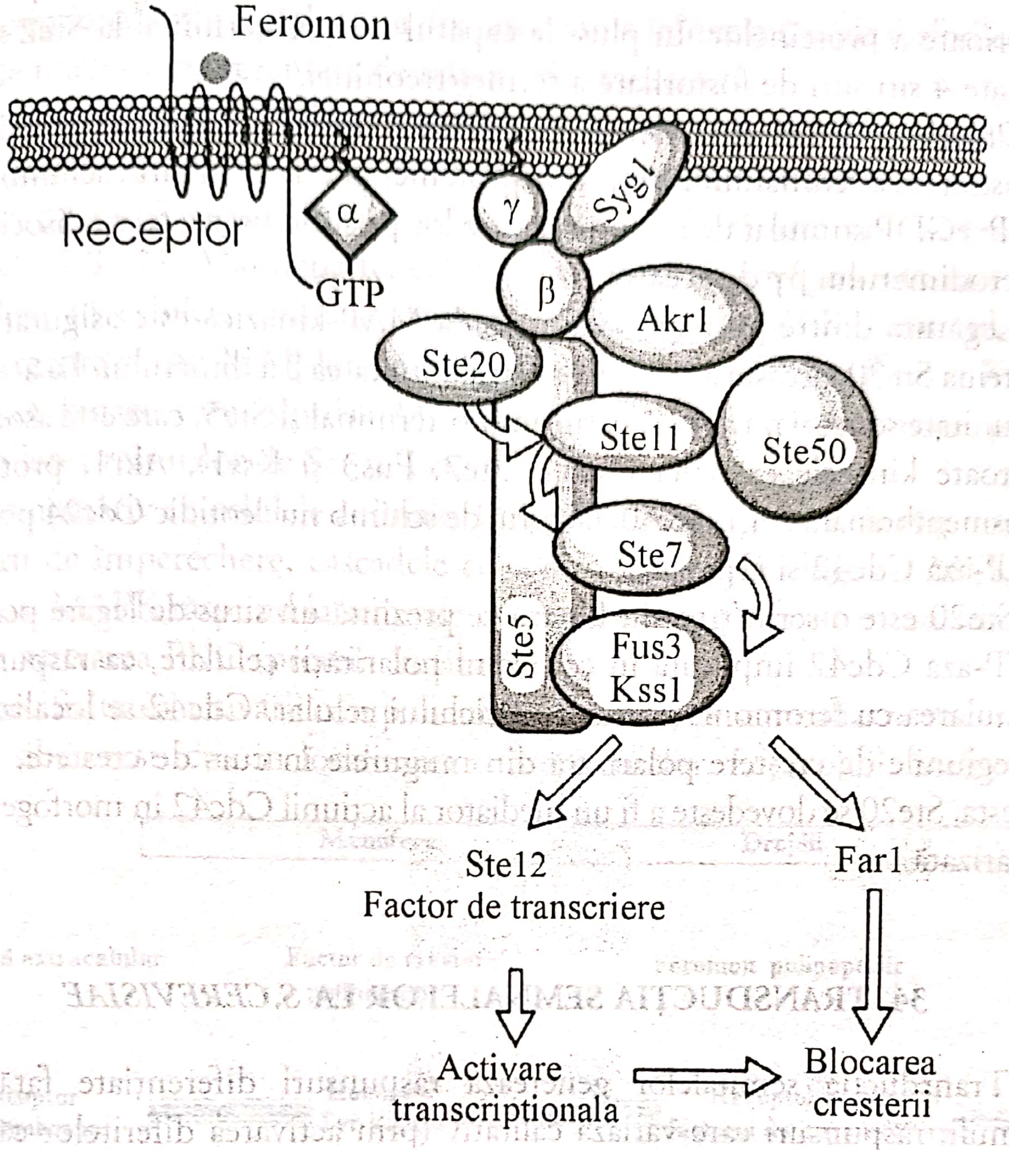

Feromon
Receptor
α
GTP
γ
Syg1
β
Akr1
Ste20
Ste11
Ste50
Ste7
Ste5
Fus3
Kss1
Ste12
Factor de transcriere
Far1
Activare transcriptionala
Blocarea cresterii

Fig. 43 — Interacțiile dintre componentele căi de răspuns la feromonii de împerechere. Receptorii de feromoni (Ste2 și Ste3) sunt cuplați la o proteină G trimerică, alcătuită din subunitatea α (Gpa1), subunitatea β (Ste4) și subunitatea γ (Ste18). Activarea proteinei G, printr-un receptor stimulat de feromon, eliberează dimerul βγ care activează componentele de semnalizate plasate în aval *(downstream)*. Această activare este pusă pe seama catalizării de către βγ a asocierii kinazei STE20 cu proteina *'scaffold'* Ste5. Alte proteine ce interacționează cu dimerul βγ sunt: proteinele Akr1 și Syg1, fară ca acestea să joace un rol major în răspuns. MAP kinazele Fus3 și Kss1 sunt activate printr-o cascadă de fosforilare ce implică proteinele Ste7 (MEK) și Ste11 (MEKK). Ste50 se asociază cu Ste11 și este necesară pentru transducția propriu-zisă a semnalului. MAP kinazele reglează activitatea factorului de transcriere Ste12, în vederea stimulării transcrierii induse de feromon, și proteina Far1, implicată în controlul ciclului celular (după Leberer și colab., 1997).

ulterioare a proteinelor. În plus, la capătul carboxi-terminal la Ste2 sunt plasate 4 situsuri de fosforilare a serinei/treoninei.

Proteina G heterotrimerică este următoarea componentă a căi de transducție a semnalului. Activarea proteinei G este rezultatul schimbului GTP→GDP stimulat de receptor, ce are loc pe subunitatea α, cu disocierea heterodimerului $\beta\gamma$ de aceasta.

Legătura dintre proteina G și cascada MAP-kinazică este asigurată de proteina Ste20, această asociindu-se cu subunitatea β a dimerului. La această subunitate se asociază prin capătul amino-terminal și Ste5, care este asociată cu toate kinazele cascadei (Ste11, Ste7, Fus3 și Kss1), Akr1, proteina transmembranară Syg1, Ste50, factorul de schimb nucleotidic Cdc24 pentru GTP-aza Cdc42 și Gpa1.

Ste20 este o serin/treonin-kinază ce prezintă un situs de legare pentru GTP-aza Cdc42 implicată în controlul polarității celulare, ca răspuns la stimularea cu feromoni, și în cursul ciclului celular. Cdc42 se localizează la regiunile de creștere polarizată din mugurele în curs de creștere. Prin aceasta, Ste20 se dovedește a fi un mediator al acțiunii Cdc42 în morfogeneza polarizată.

34. TRANSDUCȚIA SEMNALELOR LA *S.CEREVISIAE*

Transducția semnalelor generează răspunsuri diferențiate față de stimuli, răspunsuri care variază calitativ (prin activarea diferitelor căi de semnalizare) sau cantitativ (prin activarea acestor căi cu intesitate diferită sau pe perioade diferite de timp). O trăsătură importantă a acestor căi de semnalizare este că ele evoluează divergent și convergent, astfel încât permit apariția de răspunsuri diferite, dar suprapuse, în diferite circumstanțe. Convergența acestor căi este ilustrată de abilitatea diferitelor tipuri de semnale extracelulare de inițiere de a activa MAP kinazele (Fig. 44.).

Calea de semnalizarea MAP kinazică reprezintă una din căile de transducție intracelulară a semnalelor. MAP kinale pot fi activate de o varietate de stimuli (stimularea creșterii celulare, diferențierea celulară) și joacă un rol central în controlul modificărilor fenotipului celular. MAP kinazele sunt serin/treonin-kinaze, activarea presupunând dubla fosforilare a acestora. Efectul final al activarii căii îl constituie schimbarea *pattern*-ului transcripțional, prin translocarea din citoplasmă în nucleu, unde fosforilează țintele nucleare reprezentate de factorii de transcriere.

La drojdii, inițierea căii de transducție a semnalelor constă în interacția factorilor de împerechere polipeptidici cu proteina G trimerică, ai cărei dimeri βγ (Ste2,3) activează kinaza Ste20 care, la rândul său, activează MEKK și Ste11. Mai departe, calea se continuă cu componente care au omologi în celulele animale. Ste1 este omolog cu MEK (punctul de convergență al căii MAP-kinazice de la celulele animale), iar Fus3 și Kss1 codifică kinaze care, similar MAP kinazei animale, sunt activate prin fosforilarea resturilor de Ser și Tyr.

Comparativ cu celulele animale, la drojdii, pe lângă calea de răspuns la factorii de împerechere, cascadele ce conțin kinaze omologe cu MEKK, MEK și MAPK răspund la semnale inițiate de modificări ale osmolarității sau la activarea PKC (protein kinaza C).

Specificitatea activării componentelor cascadei de semnalizare este dată de posibila restricție în localizarea componentelor. La drojdii, Ste5 este

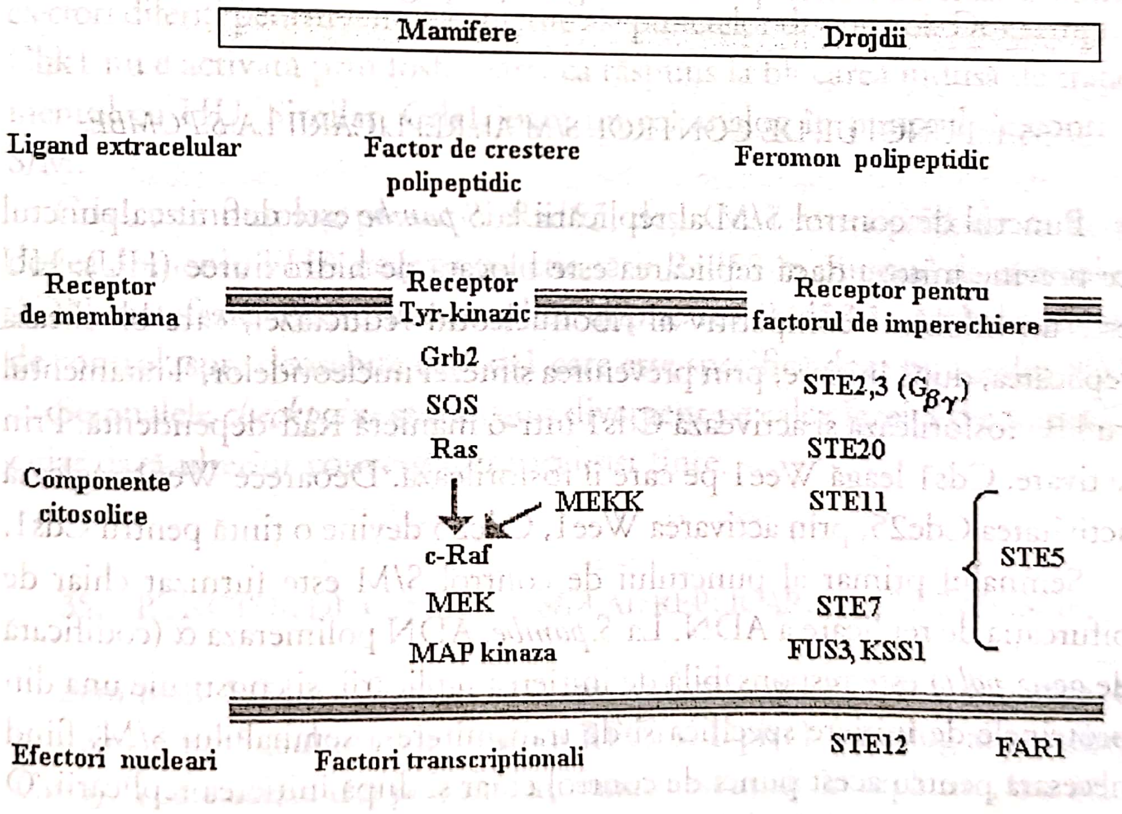

Mamifere
Drojdii
Ligand extracelular
Factor de crestere polipeptidic
Feromon polipeptidic
Receptor de membrana
Receptor Tyr-kinazic
Receptor pentru factorul de imperechiere
Grb2
SOS
Ras
STE2,3 (Gβγ)
STE20
Componente citosolice
MEKK
STE11
c-Raf
STE5
MEK
STE7
MAP kinaza
FUS3, KSS1
Efectori nucleari
Factori transcriptionali
STE12
FAR1

Fig. 44— Proteine omologe alcătuiesc cascadele de transducție a semnalelor la drojdii și mamifere (după Leberer și colab., 1997).

implicată în cascada dintre Ste2, 3 și Fus3, Kss1. La acest nivel, Ste5 se leagă la trei dintre kinaze, respectiv Ste11 (MEKK), Ste7 (MEK) și Fus3 (MAPK). Acest complex se formează înainte ca fiecare kinază să activeze kinaza următoare a cascadei. Legarea kinazelor se face în regiuni diferite ale Ste5, fapt ce previne activarea kinazelor altor cascade.

35. REPLICAREA ADN LA *S.CEREVISIAE*

Replicarea genomului reprezintă un eveniment critic al ciclului celular, responsabil de menținerea integrității genetice a unui organism. Erorile de replicare a ADN pot conduce la pierderea de cromozomi, deleții cromozomale sau mutații genice specifice. Prin urmare, replicarea ADN este supusă unui reglaj sever la nivelul punctelor de control a replicării ADN în cursul ciclului celular, extinderea, durata și acuratețea replicării ADN fiind monitorizate cu atenție pentru a asigura propagarea corectă a genomului.

35.1. PUNCTUL DE CONTROL S/M AL REPLICĂRII LA *S.POMBE*

Punctul de control S/M al replicării la *S.pombe* este definit ca punctul ce previne mitoza dacă replicarea este blocată de hidroxiuree (HU). HU este un inhibitor competitiv al ribonucleotid reductazei, care blochează replicarea, după inițiere, prin prevenirea sintezei nucleotidelor. Tratamentul cu HU fosforilează și activează Cds1 într-o manieră Rad-dependentă. Prin activare, Cds1 leagă Wee1 pe care îl fosforilează. Deoarece Wee1 reglează activitatea Cdc25, prin activarea Wee1, Cdc25 devine o țintă pentru Cds1.

Semnalul primar al punctului de control S/M este furnizat chiar de bifurcația de replicare a ADN. La *S.pombe*, ADN polimeraza α (codificată de gena *pol1*) este responsabilă de inițierea replicării și constituie una din proteinele de inițiere specifică și de transmitere a semnalului S/M, fiind necesară pentru acest punct de control chiar și după inițierea replicării. O altă proteină, probabil implicată în controlul replicării, este proteina Cut5. Rolul său în replicare și în generarea acestui semnal este încă neclar.

implicată în cascada dintre Ste2, 3 și Fus3, Kss1. La acest nivel, Ste5 se leagă la trei dintre kinaze, respectiv Ste11 (MEKK), Ste7 (MEK) și Fus3 (MAPK). Acest complex se formează înainte ca fiecare kinază să activeze kinaza următoare a cascadei. Legarea kinazelor se face în regiuni diferite ale Ste5, fapt ce previne activarea kinazelor altor cascade.

35. REPLICAREA ADN LA *S.CEREVISIAE*

Replicarea genomului reprezintă un eveniment critic al ciclului celular, responsabil de menținerea integrității genetice a unui organism. Erorile de replicare a ADN pot conduce la pierderea de cromozomi, deleții cromozomale sau mutații genice specifice. Prin urmare, replicarea ADN este supusă unui reglaj sever la nivelul punctelor de control a replicării ADN în cursul ciclului celular, extinderea, durata și acuratețea replicării ADN fiind monitorizate cu atenție pentru a asigura propagarea corectă a genomului.

35.1. PUNCTUL DE CONTROL S/M AL REPLICĂRII LA *S.POMBE*.

Punctul de control S/M al replicării la *S.pombe* este definit ca punctul ce previne mitoza dacă replicarea este blocată de hidroxiuree (HU). HU este un inhibitor competitiv al ribonucleotid reductazei, care blochează replicarea, după inițiere, prin prevenirea sintezei nucleotidelor. Tratamentul cu HU fosforilează și activează Cds1 într-o manieră Rad-dependentă. Prin activare, Cds1 leagă Wee1 pe care îl fosforilează. Deoarece Wee1 reglează activitatea Cdc25, prin activarea Wee1, Cdc25 devine o țintă pentru Cds1.

Semnalul primar al punctului de control S/M este furnizat chiar de bifurcația de replicare a ADN. La *S.pombe*, ADN polimeraza α (codificată de gena *pol1*) este responsabilă de inițierea replicării și constituie una din proteinele de inițiere specifică și de transmitere a semnalului S/M, fiind necesară pentru acest punct de control chiar și după inițierea replicării. O altă proteină, probabil implicată în controlul replicării, este proteina Cut5. Rolul său în replicare și în generarea acestui semnal este încă neclar.

La punctul de control al leziunilor ADN din faza G2, punctul S/M previne mitoza prin blocarea defosforilării Tyr de la Cdc2. Acest mecanism, nu reduce activitatea Cdc2, ci o menține la un nivel interfazic.

Studiile genetice arată că Cdc25 este ținta punctului de control S/M. Mai mult, ca și în cazul lezării ADN, în cursul fazei G2, tratamentul cu HU scade rata defosforilării Cdc2 de către Cdc25. Deoarece *in vitro* Wee1 este fosforilată și de una dintre kinazele punctului de control S/M, punctele de control S/M și G2/M prezintă ținte ce se suprapun sau chiar sunt identice.

Similar punctului de control G2, și în punctul de control S/M sunt implicate proteinele Rad. Este posibil ca toate genele *rad* de tip *checkpoint* să fie necesare ambelor puncte de control, deoarece în ambele cazuri recepționează același semnal primar reprezentat de ADN monocatenar. Alternativ, s-a sugerat faptul că proteinele Rad formează un complex cu roluri separate în cele două puncte de control, complex ale cărui subunități funcționează în unul sau celălalt punct.

Deși proteinele Rad sunt necesare ambelor puncte de control, ele prezintă efectori diferiți pentru semnale diferite ale punctelor de control. De exemplu, Chk1 nu e activată prin fosforilare, ca răspuns la blocarea indusă de tratamentul cu HU. Similar, Cds1 joacă un rol analog în punctul de control S/M.

Cds1 este omolog proteinei Rad53, deși Cds1 este lipsită de ce de-al doilea domeniu FHA necesar funcționării Rad53 în punctul de control al ADN metafazic. Acest lucru explică implicarea Rad53 în ambele puncte de control, spre deosebire de Cds1 care este specifică doar punctului S/M.

Semnalele *checkpoint* se transmit divergent pe calea fazei S și a fazei G2, chiar dacă ulterior converg către aceleași ținte.

35.2. PUNCTUL DE CONTROL S/M AL REPLICĂRII LA *S.CEREVISIAE*.

Semnalul S/M la *S.cerevisiae* este transmis de ADN polimeraza ϵ, proteinele Rfc5 (subunitatea mică a RFC) și Dpb11 (omolog al proteinei Cut5). Toate aceste trei proteine au funcții esențiale în replicare, dar rolul lor în punctul de control S/M este independent de aceasta. Ca și în punctul de control metafazic al ADN lezat, proteinele Mec1 și Rad53 sunt necesare transducției semnalului S/M. Mecanismul de reglare a mitozei de către punctul de control S/M este încă neclar.

35.3. COMPARAȚIE CU EUCARIOTELE SUPERIOARE

Combinarea sistemului *S.cerevisiae*, ce prezintă punctele de control START și metafazic ale ciclului celular, și sistemul *S.pombe*, cu punctul de control G2/M, acoperă toate mecanismele de control majore ale ciclului celular în celulele animale. Toate punctele de control cunoscute la animale sunt prezente la una sau ambele drojdii, iar mecanismele acestora par a fi conservate evolutiv.

La om, ca și la drojdii, rolul cheie în punctele de control este jucat de ATM, o protein-kinază ADN-dependentă (DNA-PK). Mutația genei ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) este responsabilă de predispoziția față de cancer și s-a demonstrat implicarea produsului codificat de aceasta în multe puncte de control ale lezării ADN la mamifere. Pe lângă ATM, la mamifere s-au identificat omologi ai diferitelor proteine *checkpoint*, precum hRad1, hRad9 și hHus1.

Informațiile privind punctele de control G2/M de la *S.pombe* și *S.cerevisiae* permit compararea celor două specii de drojdii între ele sau cu celulele animale. Astfel, s-a constat că mecanismele de inițiere și transmitere a semnalelor *checkpoint* sunt conservate atât la eucariotele inferioare cât și superioare. În cadrul modelului funcțional, conceput pe baza acestor informații, în centrul tuturor punctelor de control se află o kinază de tip DNA-PK (protein-kinaza dependentă de ADN). Pentru recunoașterea diferitelor semnale (de tipul ADN lezat, blocarea replicării), aceste kinaze se asociază cu diferite subunități reglatorii. Aceste kinaze ADN-dependente joacă rol de activatori ai uneia sau mai multor kinaze cu funcție de semnalizare. Cel puțin în cazul Rad53 și Cds1, se pare că există o serie de ținte finale independente.

Țintele G2/M ale ciclului celular sunt conservate la drojdii și mamifere. Un exemplu semnificativ este oferit de controlul tranziției G2 → M. Astfel, ca și la *S.pombe*, celulele mamiferelor reglează fosforilarea tirozinei Cdc2 pentru a preveni intrarea în mitoză, în prezența unui ADN lezat sau nereplicat. Omologul uman al proteinei Chk1 este fosforilat ca răspuns la lezarea ADN și se poate lega la și fosforila proteina umana hCdc25C. Această fosforilare are loc la nivelul restului Ser216, situsul major al fosforilării interfazice a Cdc25C *in vivo*, și crează un situs de legare de tip 14-3-3. Acest fapt, sugerează un model în care ADN-ul lezat determină fosforilarea Cdc25C de către hChk1 la Ser216. Inactivarea sau sechestrarea Cdc25C, prin legarea situsului 14-3-3, blochează celulele în G2 prin prevenirea defosforilării Tyr din Cdc2.

În celulele animale nu s-a identificat un punct de control metafazic al ADN lezat, dar ele posedă un punct de control metafazic al fusului de diviziune care pare a fi omolog punctului de control al fusului de diviune de la *S.cerevisiae*.

36. STRUCTURA REPLICATORILOR DE LA *S.CEREVISIAE*

Definirea precisă a elementelor genetice și proteinelor ce direcționează inițierea replicării ADN este esențială pentru înțelegerea reglării acestor evenimente în cursul ciclului celular. Studiile genetice la drojdii (*S.cerevisiae* și *S.pombe*) au identificat atât replicatorii – situsurile de inițiere a replicării - cât și proteinele ce recunosc aceste elemente cromozomale.

Replicatorii de la *S.cerevisae* sunt cei mai bine definiți dintre organismele eucariote (Fig. 45.). Identificate inițial ca secvențe de replicare autonomă (ARS - *Autonomously Replicating Sequences*) capabile să asigure menținerea extracromozomală a plasmidelor de drojdie, studiile ulterioare au arătat că aceste elemente servesc la direcționarea replicării ADN în cromozomii nativi, inițierea replicării la nivelul acestor secvențe realizându-se bidirecțional.

În principiu, genomul de *S.cerevisiae* conține cca. 400 replicatori, viteza de deplasare a bifurcației de replicare fiind de 2kpb/min. Secvențele ARS de la drojdii sunt regiuni ADN de ~150pb ce conțin o secvență consensus ACS (*ARS Consensus Sequence*) conservată evolutiv, cu o lungime de 11pb și bogată în AT, esențială pentru funcționarea originii replicării. Această secvență ACS nu este suficientă pentru funcționarea ARS, în acest proces fiind implicate și două sau trei elemente ADN stimulatorii – elemente B1-B3 - ce flanchează ACS. Acest secvențe conțin ADN ce poate fi ușor relaxat și pot fi alcătuite din subdomenii multiple, fiecare contribuind la funcția ARS. Elementul B1 servește ca secvență suplimentară pentru legarea

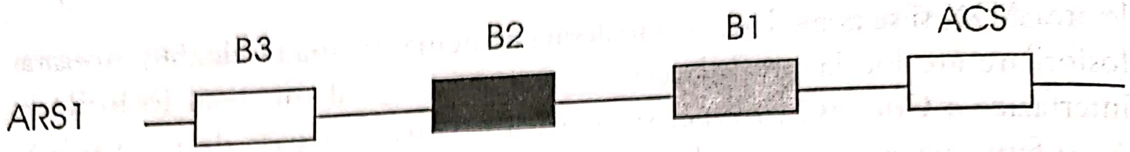


Fig. 45— Structura replicatorului ARS1 de la *S.cerevisiae.* Elementul B1 interacționează cu ORC, la elementul B3 se leagă proteina Abf1 care stimulează replicarea prin domeniul său de activare transcripțională. Elementul B2 are rol structural sau de recunoaștere (după Dobie și colab. 1999).

complexului ORC, elementul B2 are rol în menținerea stabilității replicatorului, iar elementul B3 conține o secvență de tip *Enhancer* recunoscută de factorul transcripțional Abf1 ce activează replicarea prin domeniul activator transcripțional.

37. ADN POLIMERAZE LA *S.CEREVISIAE*

Replicarea rapidă și cu acuratețe a ADN genomic presupune participarea unei serii de proteine replicative ce se asamblează la nivelul regiunii ADN ce prezintă cele două catene separate, regiune cunoscută sub numele de *bifurcație de replicare.* Setul minim de proteine replicative include o ADN, polimerază responsabilă de catalizarea replicării, o proteină de legare la ADN monocatenar, responsabilă de menținerea deschisă a bifurcației de replicare, o ADN helicază, care despiralizează regiunea ADN ce va fi replicată, și o ADN primază care oferă secvențele de primare (*primer*ii ARN) necesare sintezei catenei *lagging*. Asamblarea acestor proteine replicative necesită o coodonare strictă, obligatorie nu doar funcționării propriu-zise a sintezei catenelor ADN *leading* și *lagging* în cursul replicării, ci și în cursul asamblării și dezasamblării acestor complexe proteinice. Similitudinile de compoziție și funcție existente între replicazele ADN și componentele lor sugerează existența unui mecanism unificator pentru dobândirea coodonării macroproceselor de asamblare și elongare a ADN, ca și de dezasamblare a bifurcației de replicare.

Studiile genetice au arătat că la *S.cerevisiae* există 3 ADN polimeraze – ADNpol α, δ și ϵ - implicate în replicarea genomului. În plus, evenimentele reparatorii ale ADN (precum repararea prin excizie de baze) necesită, pe lângă ADNpolα, δ și ϵ, și ADNpolβ.

Aceste ADN polimeraze sunt structuri polipeptidice complexe deoarece, pe lângă subunitatea de polimerizare (care adesea conține o exonuclează *proofreading* 3’→5’), conțin și alte subunități funcționale (Tabel. 3.). Aceste funcții includ alte activități enzimatice (de exemplu, ADN primaza) sau permit ADN polimerazei să interacționeze cu alte proteine implicate în funcționarea punctelor de control ale ciclului celular, în replicarea sau în repararea ADN. De exemplu, ADN polδ și ε sunt încărcate la nivelul ADN de către proteinele accesorii RFC (factorul de replicare C – *Replication Factor C*), respectiv PCNA (antigen nuclear de proliferare celulară – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*). Interacția ADN polimerazelor cu aceste proteine accesorii permite creșterea vitezei de sinteză a ADN, cuplată cu o acuratețe mărită a citirii matriței ADN.

La nivel structural, ADN polimerazele par să posede un situs activ ADN polimerazic universal, extrem de conservat evolutiv, chiar dacă structura suprafeței moleculelor diferă considerabil, ca rezultat al interacției acestora cu alte proteine și enzime.

ADN polα-primaza este polimeraza majoră de replicare a ADN. Complexul ADNpolα-primaza constă din 4 subunități (subunitatea PRI1 - 167Kdal, PRI2 - 79-86Kdal, POL12 - 58Kdal și POL1 -48Kdal), dintre care subunitatea POL1 este singura enzimă capabilă să inițieze sinteza *de novo* a ADN. Subunitatea PRI1 conține centrul catalitic al primazei ce se activează numai după unirea cu subunitatea PRI2 și formarea primazei heterodimerice.

În cursul inițierii sintezei catenei *leading*, ADN polα-primaza sintetizează un *primer* ARN scurt la nivelul originii replicării și un *primer* ARN pentru fragmentele Okazaki de pe catena *lagging*. Fragmentele Okazaki sunt regiuni scurte de ADN prezente pe catena *lagging* a bifurctației de replicare, ce se formează discontinuu deoarece toate ADN polimerazele sintetizează ADN numai în direcția 5’→3’. Ulterior, *primerii* ARN sunt elongați la ~30-40 nucleotide prin activitatea intrinsecă a subunității POL1 a ADN polα-primazei heterotetramerice. Subunitatea POL12 nu are funcții enzimatice dar este implicată în reglarea inițierii reacției de replicare a ADN.

ADNpolβ este o polipeptidă de 39Kdal ce conține 335 aminoacizi, grupați în două domenii interconectate printr-o regiune proteazo-sensibilă. Domeniul amino-terminal este responsabil de activitatea 5’ fosfatazică, ce îndepartează 5’-deoxiribozo-fosfatul, și de funcția de legare a matriței, în vreme ce al doilea domeniu poartă activitatea de ADN polimerază. Situsul activ al ADN polβ poziționează perfect capătul 3'OH al primerului ARN, ce conduce la atacul nucleofilic pe gruparea fosfat din deoxiribonucleozid-5'trifosfatul atașat prin împerecherea bazelor azotate. Acest mecanism garantează elongarea corectă a lanțului nucleotidic, în acord cu regula de împrechere a bazelor azotate (A-T și G-C). ADN polβ este implicată în repararea prin excizie de baze a ADN.

Tabel. 3. Principalele ADN polimeraze prezente la *S.cerevisiae.* RRDC – repararea rupturilor dublu-catenare. REB – reparare prin excizie de baze. REN – reparare prin excizie de nucleotide. MMR- mismatch repair (după Hubscher și colab., 2000).

Pol	Numar subunități	Activitate enzimatică	Funcții
α	4	ADN polimeraza Primaza	Replicare: inițiere; Reparare: RRDC; reglarea lungimii TEL; Reglarea ciclului celular Sinteza ARN *primer* necesar inițierii sintezei catenei ADN *lagging*.
β	1	ADN polimeraza, fosfataza 5'	Reparare: REB, RRDC; meioza
γ	1	ADN pol, exonucleaza 3'→5'	Replicarea ADN mitocondrial
δ	4	ADN pol, exonucleaza 3'→5'	Replicare: sinteza catenei *leading* și a catenei *lagging*; Reparare: MMR, RRDC, REB, REN; Reglarea ciclului celular.
ϵ	4	ADN pol, exonucleaza 3'→5'	Replicare: catena *lagging*; Reparare: RRDC, REB, REN; Reglarea ciclului celular
ζ	2	ADN pol	Sinteza reparatorie a ADN de tip *error-prone*
η	1	ADN pol (Rad30)	Sinteza reparatorie a ADN de tip *error-free*

ADN polδ este o enzimă heterotetramerică implicată, alături de ADN polϵ, în elongarea catenelor *leading* și *lagging* și în maturarea fragmentelor Okazaki.

ADN polδ este alcătuită dintr-o subunitate catalitică de 256Kdal și o subunitate de 79Kdal. Regiunea carboxi-terminală a enzimei acționează ca un senzor al replicării ADN, ce coordonează răspunsurile transcripționale și ale ciclului celular, în cazul blocării replicării sau lezării ADN în cursul fazei S. În plus, ADN polε este necesară în repararea prin excizie de nucleotide.

ADN polimerazele δ, ζ și η sunt implicate cu precădere în repararea leziunilor ADN. ADN polζ și η acționează pe două căi independente de reparare a dimerilor de timina-timina ciclobutan (TT): (1) calea reparatorie *error-prone* (predispusă la eroare), în care ADN pol ζ poate repara o leziune prin sintetiza cu o eficiență scăzută și cu erori frecvente a ADN, și (2) calea *error-free* (liberă de eroare), în care ADN polη îndepărtează eficient și cu mare fidelitate dimerii TT.

38. MECANISMUL INIȚIERII REPLICĂRII LA *S.CEREVISIAE*

Există un paralelism sugestiv între mecanismele de inițiere a replicării la procariote și eucariote. La *E.coli*, inițiatorul DnaA se leagă la originile replicării (oriC) și determină distorsiunea și ‚topirea' duplexului ADN, cu separarea monocatenelor matriță. Ulterior, helicaza replicativa DnaB este plasată la nivelul inițiatorului DnaA prin intermediul factorului DnaC de încărcare a helicazei. Factorul DnaC ajută la ‚prinderea' helicazei DnaB în jurul ADN, care devine activă o dată cu eliberarea Dna C. Din acest moment replicarea se desfășoară prin asamblarea ADN polimerazei și primazei cu helicaza.

În momentul de față, modelul replicării ADN la eucariote include un inițiator reprezentat de complexul de recunoaștere a originii ORC (*Origin Recognition Complex*), o helicază formată de proteinele MCM (*Minichromosome maintenance*) și factorul Cdc6 (la *S.cerevisiae*)/Cdc18 (la *S.pombe*) de încărcare a helicazei MCM la ADN (Fig. 46). Conform acestui model, replicarea debutează cu formarea unui complex pre-replicativ (pre-RC - *pre-Replicative Complex*) ce implică încărcarea helicazei MCM pe ADN, activitatea helicazei fiind inhibată până când evenimentele ce însoțesc faza **S** a ciclului celular țintesc inițierea replicării.

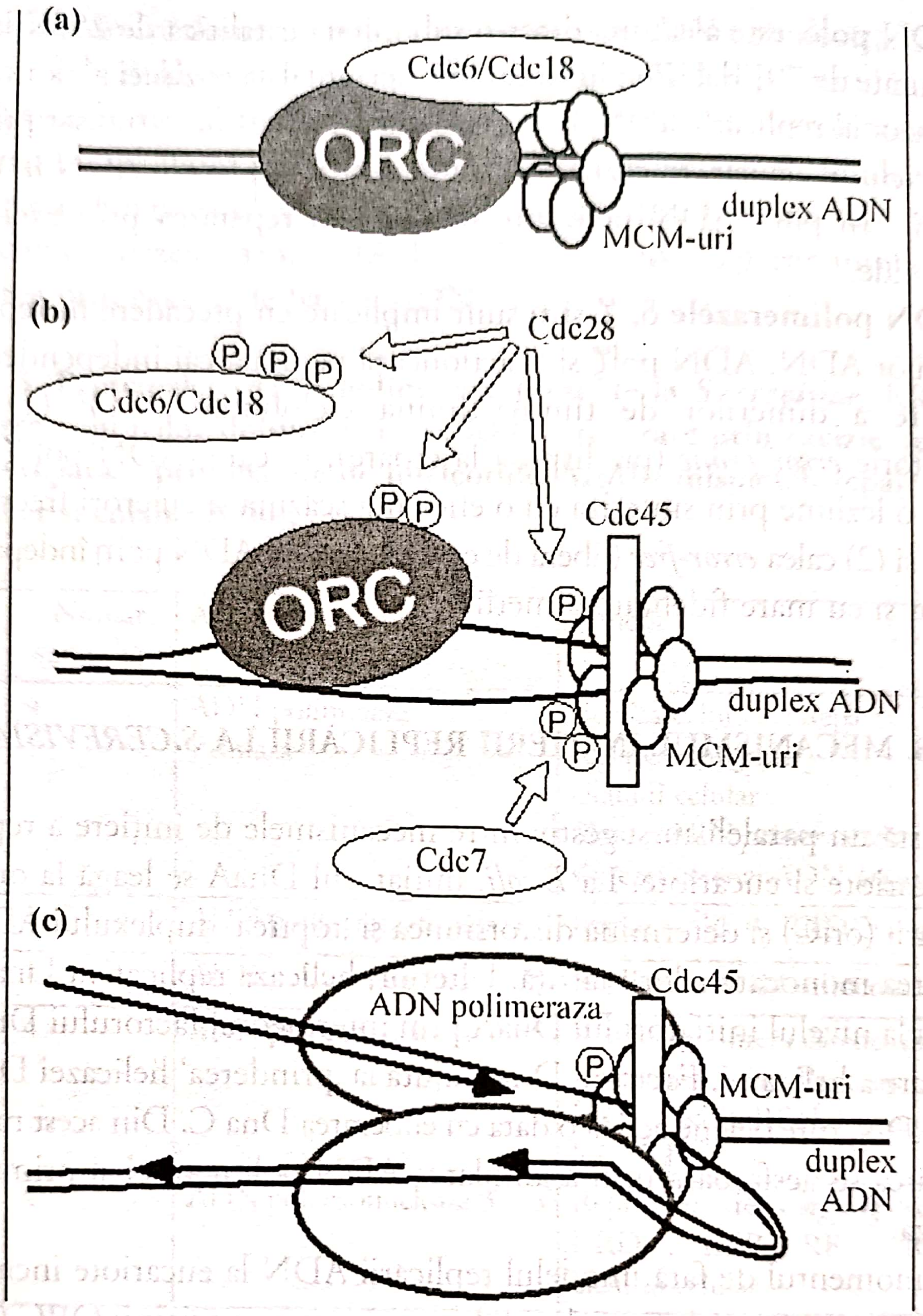

(a)
Cdc6/Cdc18
ORC
duplex ADN
MCM-uri
(b)
Cdc28
P P P
Cdc6/Cdc18
P P
ORC
Cdc45
P
duplex ADN
P
P
MCM-uri
Cdc7
(c)
Cdc45
ADN polimeraza
P
MCM-uri
duplex ADN

Fig. 46 — Inițierea replicării la drojdii. (a) Complexul ORC și factorul Cdc6 încarcă helicază MCM pe ADN cu formarea complexului pre-RC. (b) Kinaza DDK (cdc7-Dbf4) și Cdc28 țintesc inițierea replicării prin dezasamblarea complexului pre-RC și activarea helicazei MCM. ORC eliberat din pre-RC poate stabiliza un complex deschis în cursul procesului de inițiere. Cdc28 este necesară pentru legarea proteinei esafod Cdc45 la helicaza MCM. (c) Asamblarea complexului ADN - polimeraze este simultană formării bifurcației de replicare. La drojdii, helicaza MCM și proteina esafod Cdc45 se deplasează o dată cu bifurcația de replicare (după Leatherwood, 1998).

Inițiatorul ORC recrutează factorii de inițiere a replicării (MCM și Cdc6/Cdc18) la originile replicării. La drojdii, ORC este un complex de 6 componente (Orc 1-6) ce se leagă specific, într-o manieră ATP-dependentă, la un situs ADN de 18pb adiacent elementului B1 din ACS. Cele 6 subunități sunt esențiale pentru initerea replicării și sunt codificate de gene *orc1-orc6* conservate evolutiv. Subunitățile Orc1, Orc4 și Orc5 conțin situsurile de legare la nucleotide. Subunitatatea Orc1 impreună cu subunitățile Orc2 și Orc4 contactează una din catenele ADN la nivelul scobiturii majore a ACS, în vreme ce Orc5 intercaționează cu elementul B1.

Proteina Cdc6 /Cdc18 joacă un rol central în controlul replicării ADN, împiedicând re-replicarea genomului, în corelație cu ciclin-dependent kinazele. La *S.cerevisiae*, Cdc6 permite doar asamblarea complexelor pre-RC la trecerea din Anafază în faza **G1** târzie. La *E.coli*, inițiatorul replicării– DnaA - se leagă la originea replicării și catalizează formarea complexului deschis (*open complex formation*) în care duplexul ADN este ‚topit' la două monocatene ADN. În mod similar, la puntul de inițiere a replicării, ORC induce apariția de distorsiuni ale ADN dar, spre deosebire de DnaA, ORC interacționează și stabilizează una din catenele ADN de la nivelul ACS.

Complexul pre-RC stabilește starea de ‚autorizare' a replicării ADN, formarea sa realizându-se printr-o asamblare secvențială strictă ce debutează cu legarea ORC la cromatină, urmată de legarea Cdc6/Cdc18 și ulterior a MCM la nivelul ARS. Cdc6 este factorul de încărcare a MCM pe cromatină, având și rol de menținere a stării pre-replicative.

MCM este un dublu-complex heterohexameric (dimeri ai subunităților Mcm4, Mcm6 și Mcm7) cu rol de helicază replicativă necesară etapelor de inițiere și de elongare a replicării ADN. MCM este o ATP-ază hexamerică tipică ce înconjoară duplexul ADN, prezentând o cavitate centrală în care se acomodează ADN-ul. Helicaza MCM se leagă la proteina Cdc45 ce reprezintă un factor cu rol de esafod („*scaffold*"), ce menține împreună complexele de polimerizare ale catenelor *leading* și *lagging*. Similar DnaB de la *E.coli*, helicaza MCM activează ADN polα/primaza – enzima ce sintetizează *primerii* ARN.

La drojdii, helicaza MCM impreună cu proteina Cdc45 se deplasează concomitent cu bifurcația de replicare. În contrast, la celelalte eucariote, activitatea MCM de ADN helicază ATP-dependentă se desfășoară în direcția

3'→5', MCM migrând în cursul replicării pe catena *leading* (catena continuă) a bifurcației de replicare, spre deosebire de direcționarea 5'→3'a activității DnaB de la *E.coli* ce migrează pe catena *lagging* (catena discontinuă).

O dată format, complexul pre-RC rămane inactiv până în faza **S** a ciclului celular. La intrarea în faza **S**, tranziția de la complexul pre-replicativ la complexul de inițiere a replicării, la nivelul ARS, presupune activarea pre-RC de două kinaze specifice fazei S, ce acționează în etape diferite ale activarii pre-RC. Cele două kinaze sunt: kinaza DDK (kinaza dependentă de proteina activator Dbf4 -*Dbf4-Dependent Kinase*) și Cdc28 (*cycle reglatory cyclin dependent kinase*). Într-o primă etapă, are loc asamblarea kinazei DDK prin legarea subunității catalitice Cdc7 la proteina activator Dbf4. Kinaza DDK (Cdc7-Dbf4) forforilează subunitatea Mcm2 din complexul MCM, cu eliberarea helicazei din complexul pre-RC inactiv. Activarea MCM stimulează încărcarea sa la nivelul ADN monocatenar. Ulterior intervine Cdc28 care se asociază fizic și fosforilează Cdc45, proteina ce se atașează la cromatină numai după legarea helicazei MCM. După acțiunea kinazelor Cdc7-Dbf4 și Cdc28, Cdc45 se asociază cu MCM încărcat pe cromatină, în calitate de component al pre-RC, asociere care reprezintă punctul cheie al formării complexului de inițiere a replicării.

Proteina Cdc45 este un element cheie pentru conversia pre-RC la complexul de inițiere a replicării. Cdc45 este o proteina 'eșafod' ce interacționează direct cu helicaza MCM și menține impeună helicaza MCM cu polimerazele și proteinele replicative: ADN polimeraza α cu rol de primază (ADN polα/ primaza), ADN polimeraza ϵ (ADN polϵ), proteina de replicare A (RPA – *Replication Protein A*) și PCNA. Pe lângă Cdc45, Dpb11 joacă un rol important în recrutarea ADN polα și ϵ la nivelul originilor de replicare. În acest context, Cdc45 și kinaza DDK (Cdc7-Dbf4) sunt interdependente, deoarece kinaza DDK eliberează și activează helicaza MCM și Cdc45 conectează helicaza cu polimerazele ale căror funcții le activează (Fig. 47.).

După ,relaxarea' ADN, ADN polα/primaza este recrutată la acesta prin interacția fizică cu proteina RPA, proteină cu specificitate de legare la ADN monocatenar. La nivelul originii replicării, ADN polα-primaza sintetizează un scurt *primer* ARN pentru catena *leading* și un *primer* ARN pentru fragmentele Okazaki de pe catena *lagging*. Ulterior, la *primerii* ARN sunt

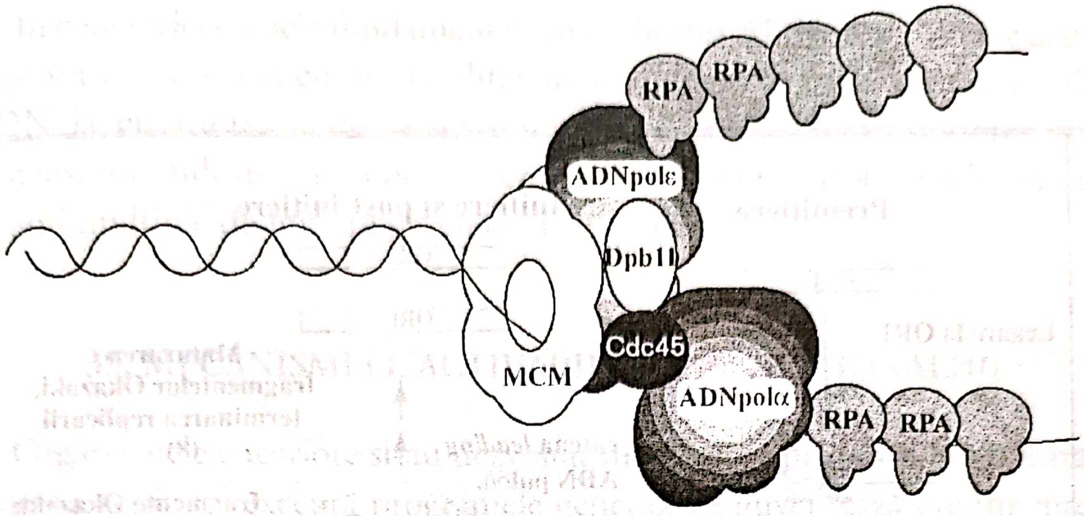


Fig. 47 — Arhitectura moleculară a complexului de inițiere a replicării la *S.cerevisiae.* După relaxarea ADN, ADN polα și ε sunt recrutate de către helicaza MCM-Cdc45. ADN polα este încărcată pe ADN cu ajutorul Cdc45, Dpb11 și RPA. ADN polε este recrutată în complex de către Dpb11 și Cdc45 (după Takisawa și colab., 2000).

atașate fragmente scurte de ADN. După sinteza primerului ARN/ADN, capatul 3' al ADN-ului nou sintetizat este recunoscut într-o manieră ATP-dependentă de factorul de replicare C (RFC- *Replication Factor C*), care încarcă PCNA la același nivel. Acesta este un factor de tip 'rampă' ("*clamp factor")* ce recrutează și încarcă ADNpol δ care va sintetiza catena *leading*. La drojdii, spre deosebire de eucariotele superioare, ADNpolε este încărcată pe cromatină independent de ADN polα, ADNpolε sintetizând catena *lagging*.

Finalizarea sintezei catenei *lagging* presupune procesarea fragmentelor Okazaki, prin îndepărtarea primerului ARN, urmată de umplerea '*gap*'-ului rezultat și ligare. La drojdii, în aceste reacții sunt implicate proteina Rad27 și DNA ligaza4.

Rad27 este o exo-endonulează 5'→3' ce posedă și activitate de RN-ază (activitate specifică monocatenară de degradare a hibrizilor ARN/ADN și de îndepărtare a ultimului ribonucleotid adiacent ADN-ului). Recent s-a identificat și proteina Dna2, o helicază ADN și nuclează monocatenară care acționează, alături de Rad27, la maturarea fragmentelor Okazaki, prin facilitarea îndepărtării primerilor ARN. De asemenea, ADN topoizomerazele I și II sunt implicate în eliberarea superăsucirilor apărute în cursul replicării ADN și în rezolvarea catenării.

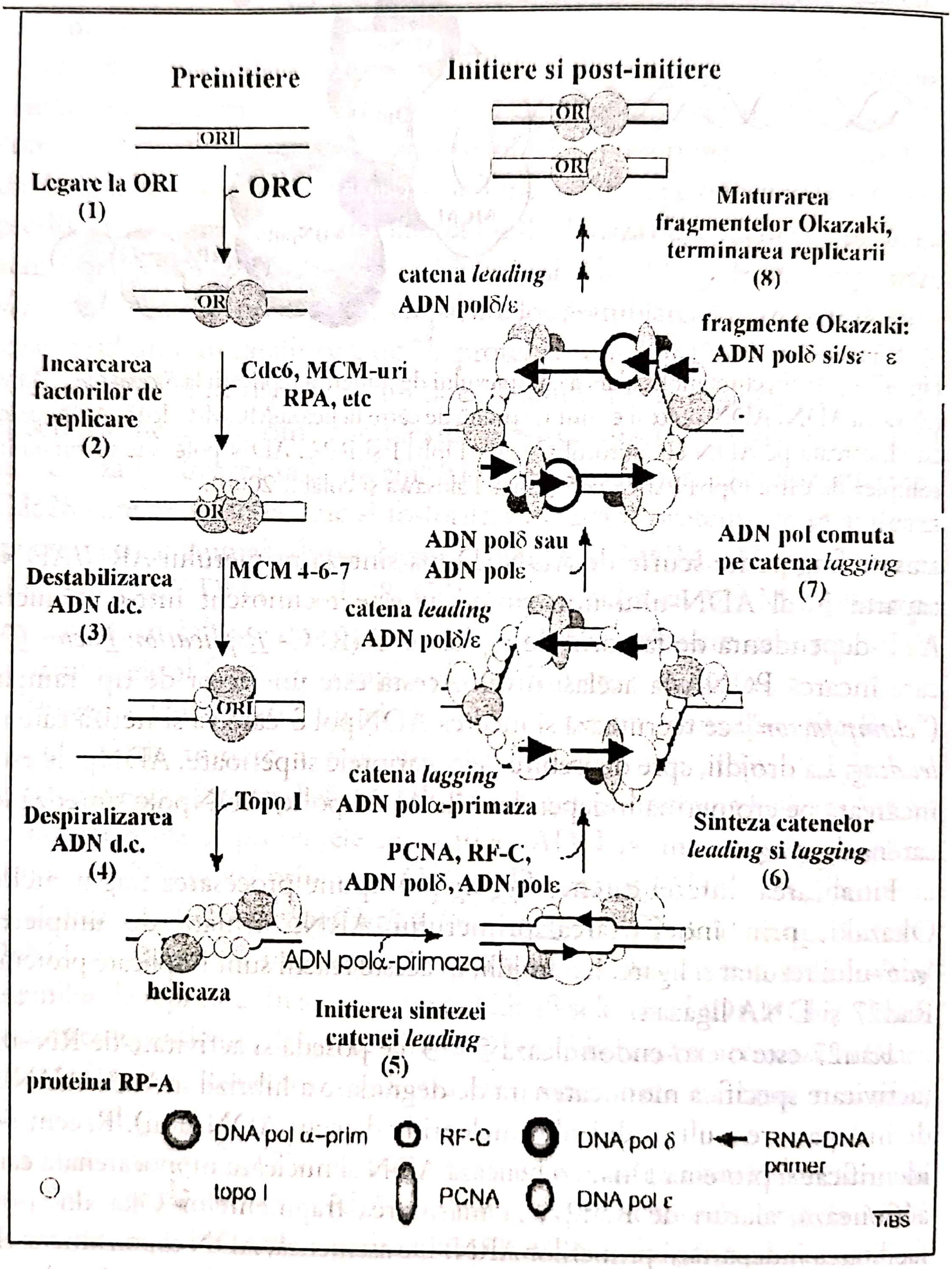

Preinitiere
Initiere si post-initiere
ORI
ORI
ORI
Legare la ORI
(1)
ORC
ORI
Maturarea fragmentelor Okazaki, terminarea replicarii
(8)
catena *leading*
ADN polδ/ε
fragmente Okazaki:
ADN polδ si/sau ε
Incarcarea factorilor de replicare
(2)
Cdc6, MCM-uri
RPA, etc
ORI
ADN polδ sau
ADN polε
ADN pol comuta pe catena *lagging*
(7)
Destabilizarea ADN d.c.
(3)
MCM 4-6-7
catena *leading*
ADN polδ/ε
ORI
catena *lagging*
ADN polα-primaza
Despiralizarea ADN d.c.
(4)
Topo I
Sinteza catenelor *leading* si *lagging*
(6)
PCNA, RF-C,
ADN polδ, ADN polε
ADN polα-primaza
helicaza
Initierea sintezei catenei *leading*
(5)
proteina RP-A
DNA pol α-prim
RF-C
DNA pol δ
RNA-DNA primer
topo I
PCNA
DNA pol ε
TiBS

Fig. 48 — Mecanismul replicării la *S.cerevisiae* (după Diffley, 1994)

În concluzie, etapele fundamentale în replicarea ADN sunt similare atât la procariote cât și la eucariote, diferențele apărând în controlul replicării ADN la eucariote, unde există un numar variabil de cromozomi cu dimensiuni mult mai mari decât a cromozomului procariot și unde există origini multiple de inițiere a replicării (Fig. 48.).

39. MECANISMELE ACTIVĂRII TRANSCRIPȚIONALE

Organismele eucariote și-au dezvoltat mecanisme prin care modulează expresia genică și execută programele genetice ce guvernează evenimente esențiale precum dezvoltare și diferențiere. Expresia genică este reglată predominant la nivel transcripțional. Studiile biochimice au stabilit că sinteza ARNmesager (ARNm) de către ARN polimeraza II (ARN polII) multisubunitară necesită asamblarea secvențială a complexelor proteinice multiple la nivelul promotorilor genelor eucariote. Acest proces implică două tipuri distincte de elemente ADN: promotori și *enhancer*-i. Promotorul specifică situsul de inițiere cu acuratețe a transcrierii, iar *enhancer*-ii direcționează *pattern*-urile spațiale și temporale de transcriere selectivă a genelor. *Enhancerii* sunt elemente genetice recunoscute și legate de către activatori specifici genelor, activatori ce stimulează nivelul de transcriere. Acțiunea acestor proteine legate la *enhanceri* cu specificitate de secvență reprezintă principalul mecanism de activitare diferențiată a genelor.

Sinteza ARNm de către ARN polII parcurge mai multe etape secvențiale desemnate ca: (1) preinițierea și inițierea, (2) elongarea și (3) terminalizarea transcrierii (Fig. 49.).

39.1. PREINIȚIEREA ȘI INIȚIEREA TRANSCRIERII

Asamblarea complexelor de transcriere la nivelul promotorilor celulelor eucariote implică două etape distincte ce presupun: (a) remodelarea cromatinei și (b) recrutarea complexelor proteinice ce includ proteina TBP de legare la cutia TATA (*TATA box*) a 'miez'-ului promotorului și holoenzima ARN polII .

39.2. REMODELAREA CROMATINEI

Remodelarea cromatinei – în mod obișnuit 'miez'-ul promotorului este inaccesibil mașinăriei transcripționale, fiind menținut în stare inactivă datorită organizării înalt ordonate a cromatinei. Rolul cromatinei în procesul de transcriere a fost stabilit prin studiul activităților de modificare a cromatinei de către (a) mașinăria ATP-dependentă de remodelare a cromatinei, exemplificată prin complexul Swi/Snf și (b) acetil-transferaze histonice (HAT) și deacetilaze (HAD). Complexele ATP-dependente de remodelare/modificare alterează fizic proprietățile nucleosomilor, iar acetilarea și deacetilarea cozilor amino-terminale histonice, înalt conservate, joacă un rol critic în reglajul eficient al transcrierii.

39.3. CROMOZOMUL ȘI REGLAREA TRANSCRIERII LA *S.CEREVISIAE*

Nivelul ridicat de compactare a cromatinei represează expresia genelor, ca o consecință a formării nucleosomilor peste regiunile promotor. Prin urmare, toate procesele nucleare, inclusiv transcrierea ADN, necesită participarea unor enzime ce accesează ADN-ul matriță (*DNA template*). În cazul transcrierii ADN, s-a demonstrat că împachetarea complexă a fibrei nucleosomale - colectiv denumită " structură înalt ordonată" (*higher order structure*) - joacă un rol important în relația dintre cromatină și transcriere.

Rolul activ jucat de cromatină în reglarea expresiei genice s-a studiat în special la *S.cerevisiae*, prin elucidarea reglajului specific al unor sisteme particulare. Mai mult, studii genetice recente ce vizează rolul critic jucat de histone în controlul transcripțional au relevat importanța a cel puțin trei aspecte: structura primară a histonelor, modificările covalente și interacțiile lor cu factorii transcripționali. Dată fiind conservarea aparatului de transcriere eucariot, studiile efectuate pe *S.cerevisiae* pot fi relevante și pentru eucariotele superioare. Acest lucru este dovedit și de faptul că, la *S.cerevisiae*, aproximativ toate proteinele implicate în reglajul transcripțional mediat de cromatină au omologi la om, *Drosophila sp.* sau *C.elegans*.

Date independente de acestea au descris o serie de gene implicate în reglajul transcripțional. Astfel, un prim grup de gene include genele *spt*: *spt11* și *spt12*- ce codifică histonele H2A și H2B-, gena *spt2* - ce codifică

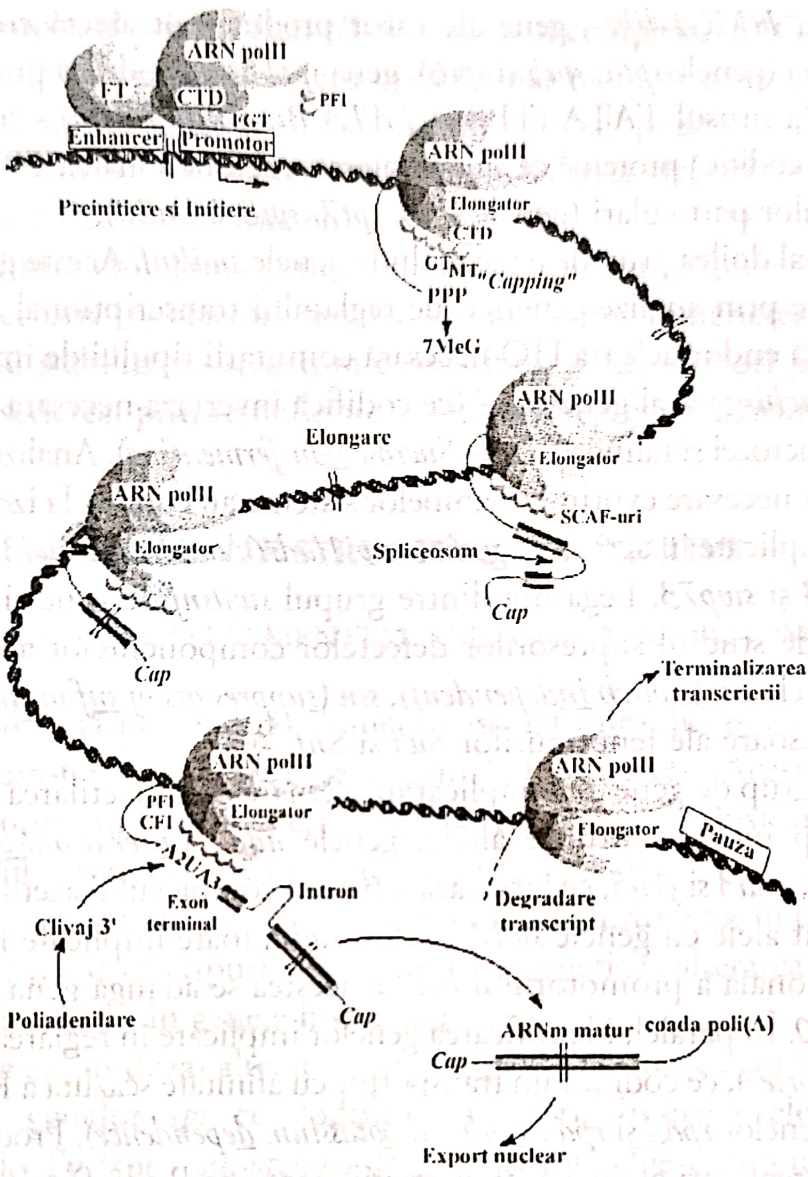

ARN polII
FT
CTD
FGT
PFI
Enhancer
Promotor
Preinitiere si Initiere
ARN polII
Elongator
CTD
GT
MT
"Capping"
PPP
7MeG
ARN polII
Elongare
Elongator
SCAF-uri
Spliceosom
Cap
ARN polII
Elongator
Cap
Terminalizarea transcrierii
ARN polII
PFI
CFI
Elongator
A2UA3
ARN polII
Elongator
Pauza
Exon terminal
Intron
Degradare transcript
Clivaj 3'
Poliadenilare
Cap
ARNm matur
coada poli(A)
Cap
Export nuclear

Fig. 49 — Reprezentarea schematică a celor trei etape majore ale transcrierii ARNm (inițierea, elongarea și terminalizarea). În etapa de inițiere, factorii de transcriere (FT) se asociază cu secvențele *Enhancer* și recrutează ARN polII, în asociere cu factorii generali de transcriere (FGT) și cu factorul de poliadenilare PAF1. În etapa de elongare, domeniul CTD al ARN polII devine hiperfosforilat, iar FGT sunt înlocuiți cu o serie de factori de elongare (Elongator). De asemenea, în această etapă, la domeniul CTD se atașează enzimele responsabile de bonetarea capătului 5' al transcriptului primar, ca și proteinele SR ce promovează asamblarea spliceosomului. În sfârșit, clivajul și poliadenilarea capatului 3' sunt realizate prin legarea factorului CF1 ce poliadenilează și eliberează ARNm din complexul de transcriere, proces stimulat de *splicing*-ul intronului terminal. Terminalizarea transcrierii se datorează, parțial, și degradării transcriptului nascent rămas (după Proudfoot, 2000)

o proteină *HMG1-like-*, gene ale căror produși pot afecta cromatina și transcrierea (genele *spt4, spt5* și *spt6*), gena *spt15* - ce codifică proteina TPB de legare la situsul TATA (TPB – *TATA Binding Protein*) - și un subset de gene ce codifică proteine ce ajută la atașarea și funcționarea TBP la nivelul promotorilor particulari (genele *spt3, spt7, spt8* și *spt20*).

Cel de-al doilea grup de gene include genele *swi/snf*. Aceste gene au fost identificate prin analize genetice ale reglajului transcripțional al genei *ho* (ce codifică endonucleaza HO necesară comutării tipului de împerechere: Swi – *Switching*) și al genei *suc2* (ce codifică invertaza necesară creșterii în prezența sucrozei și rafinozei: Snf- *Sucrose non-fermenting*). Analizele genetice ale genelor necesare exprimării ambelor sisteme au condus la izolarea seriei de gene implicate în activarea genică: *swi1/adr6, swi2/snf2, swi3, snf5, snf6, snf11, tfg3* și *swp73*. Legătura dintre grupul *swi/snf* de gene și cromatină este dată de studiul supresorilor defectelor componentelor acestui grup. Astfel, genele *sin* (*switch independent*), *ssn* (*suppressors of snf mutations*) sunt gene supresoare ale fenotipurilor *Swi* și *Snf*.

Un alt grup de gene este implicat în acetilarea și deacetilarea histonelor. Acest grup include, printre altele, genele *ada2* (*alteration/deficiency in activation*), *ada3* și *gcn5*, ce formează o parte a complexului acetiltransferazic și care sunt alele cu genele *swi7, swi8* și *swi9*, toate implicate în activarea transcripțională a promotorului *ho*. La acestea se adaugă gena *ada5*, alela genei *spt20*. În paralel, identificarea genelor implicate în reglarea genei *trk1* (*K^+ transporter*), ce codifică un transportor cu afinitate scăzută a K^+, a relevat prezența genelor *rpd3* și *rpd4* (*reduced potassium dependence*). Produșii acestor gene sunt reglatori globali ai transcrierii, proteina Rpd3 fiind subunitatea catalitică a deacetilazei histonice, iar gena *rpd4* este alela genei *sin3*, genă izolată ca supresor al mutației *swi*.

39.4. CROMATINA ȘI TRANSCRIEREA: REGLATORI POZITIVI ȘI NEGATIVI

Studiile genetice au identificat un număr mare de factori necesari reglajului transcripțional în corelație cu cromatina. În multe cazuri, aceste grupe de factori funcționează după un mecanism comun. În unele din aceste grupe funcționale, membrii lor funcționează în complexe mari: complexul

Swi/Snf, complexul Srb/mediator/holoenzimă și complexul SAGA. Aceste complexe sunt necesare transcrierii unui număr mare de gene, proteinele din aceste complexe funcționând ca reglatori globali pozitivi. În contrast, alte proteine funcționează ca reglatori negativi, direct afectați de structura cromatinei sau de modificările ei.

Relația dintre cromatină și transcriere presupune interpunerea a două tipuri de efectori: (1) efectori negativi ce nu permit trancrierea, doarece formează sau stabilizează structura cromatinei, și (2) efectori pozitivi ce permit transcrierea, prin remodelarea structurii represate a cromatinei.

40. ELEMENTE STRUCTURALE NEGATIVE

40.1. HISTONELE: ELEMENTELE MIEZULUI NUCLEOSOMAL

Fiecare histonă prezintă un domeniu asociat miezului nucleosomal și o coadă amino-terminală care emerge prin ADN-ul atașat. Acest domeniu asociat miezului nucleosomal este implicat în interacțiile histonă-histonă din interiorul miezului și în intereacțiile histone-ADN.

La drojdii, majoritatea studiilor vizând rolurile histonelor în transcriere s-a realizat prin două tipuri de manipulări genetice: alterarea expresiei histonelor și mutații în genele histonelor.

Tulpinile cu un dozaj alterat al genelor pentru histone s-au izolat prin *screening*-ul genelor *spt* ce codifică supresorii inserției elementelor transpozabile Ty (spt - *suppressors of Ty insertion*). De exemplu, locusul histonic HTA1-HTB1 ce codifică histonele H2A și H2B s-a identificat ca fiind compus din genele *spt11* și *spt12*. Prin varierea *in vivo* a dozelor genelor pentru H2A-H2B sau H3-H4 s-a observat că supresia defectelor de transcriere s-a datorat dezechilibrului în sinteza H2A-H2B comparativ cu H3-H4. O modificare și mai drastică a nivelelor de sinteză a histonelor s-a obținut prin plasarea genei pentru histona H4 sub controlul promotorului inductibil *gal1* într-o tulpină în care ambele gene H4 endogene au fost deletate. În această tulpină, histona H4 lipsește în prezența glucozei, iar structura cromatinei este alterată printr-un fenomen de pierdere nucleosomală (*nucleosome loss*). Această pierdere nucleosomală conduce la activarea genelor represate *pho5*, *cyc1* și *gal1*. Acest lucru sugerează că alterarea stoechiometriei componentelor cromatinei afectează transcrierea prin alterarea structurii cromatinei.

Rolul nucleosomilor ca represori globali ai transcrierii este demonstrat și de studiul unor mutații particulare ale histonelor, denumite mutații *sin* histonice (*histone sin mutations*). Mutațiile *sin* supresează defectele genelor *swi*, fiind capabile și de supresia unor defecte fenotipice. De exemplu, permit creșterea tulpinilor purtătoare de alele mutante *lys2* și *his4* (fenotip Spt$^-$) în medii lipsite de lizină sau histidină) și supresează defectele de transcriere cauzate de deleția parțială a domeniului carboxi-terminal al subunității mari a ARN polII (fenotip Srb$^-$). Mutațiile *sin* histonice sunt parțial dominante și determină subtituții la nivelul unui singur aminoacid, substituții limitate la aceeași regiune a suprafeței octamerului histonic. Această regiune este definită ca **domeniu funcțional SIN** și se comportă ca un reglator negativ al transcrierii. Domeniul SIN este localizat în una din punțile β din interiorul heterodimerilor H3-H4 (vezi Fig. 3.). Datorită juxtapunerii celor doi dimeri H3-H4 la nivelul axei diadei nucleosomului, mutațiile *sin* sunt capabile să întrerupă interacțiile histone-ADN prin implicarea unui tur central ADN la axa diadei. Analiza structurii *in vivo* a cromatinei la tulpinile purtătoare ale mutațiilor *sin* confirmă acest lucru, prin creșterea accesibilității la ADN nucleosomal a metiltransferazei Dam și a nucleazei micrococale (MN-aza). Acest lucru nu exclude prezența unor defecte ale intereacției cu alte proteine.

Importanța unui nucleosom intact în represia transcrierii este relevată și de rezultatele mutațiilor în resturile de Tyr ale H4, resturi implicate în interacția dintre miezul tetrameric H3-H4 și dimerul H2A-H2B. De asemenea, la nivelul histonei H2A s-a identificat o regiune distinctă, denumită "*H2A knuckle*", localizată lângă capătul amino-terminal și expusă la suprafața nucleosomului într-o regiune neimplicată în interacțiile ADN-histone (Fig. 3.A.). Se presupune că această regiune este recunoscută de un factor de legare la histone ce facilitează disocierea dimerului H2A-H2B de nucleosom.

Cozile amino-terminale ale histonelor H3 și H4 și transcrierea genelor *gal*

Complexitatea funcțională a capetelor histonice amino-terminale este demonstrată de numeroasele modificări post-translaționale ale acestora ca și de interacțiile lor cu alte proteine. Fiecare pereche de histone H3-H4 și

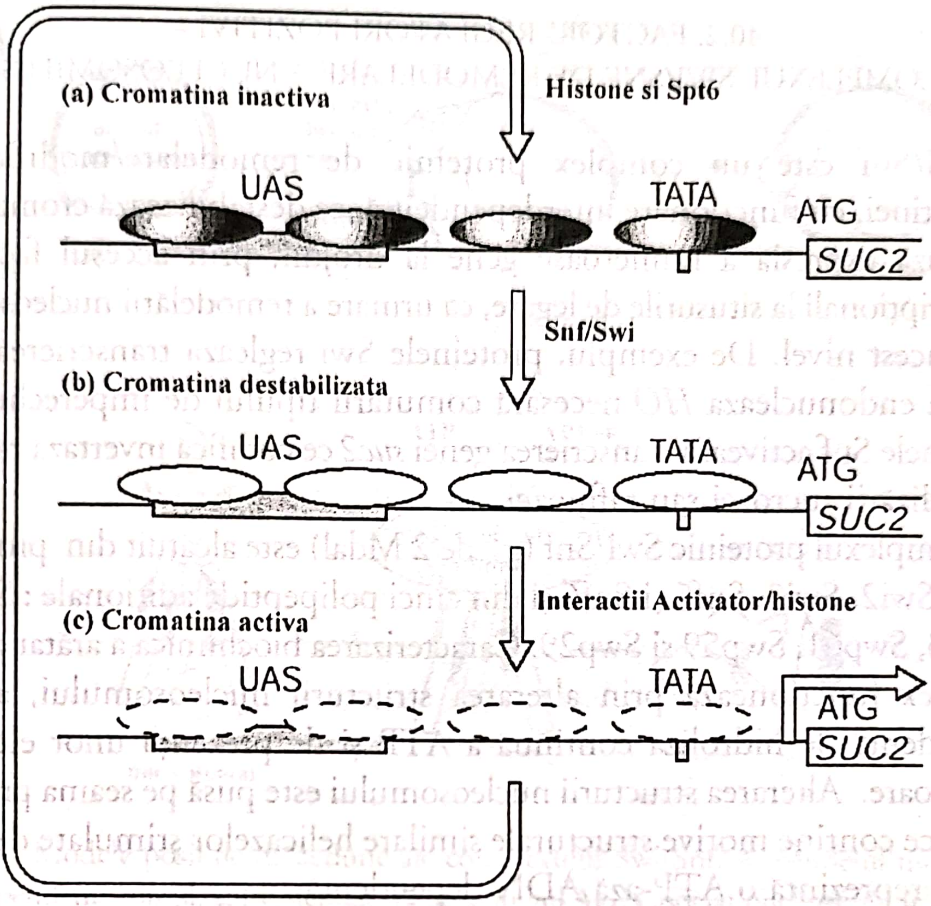

(a) Cromatina inactiva
Histone si Spt6
UAS
TATA
ATG
SUC2
Snf/Swi
(b) Cromatina destabilizata
UAS
TATA
ATG
SUC2
Interactii Activator/histone
(c) Cromatina activa
UAS
TATA
ATG
SUC2

Fig. 50 — Modelul multietapizat al inducerii sau eliminării represiei mediată nuclesomal la nivelul promotorului genei *suc2*. Represia *suc2* (a) este cauzată de formarea nucleosomului peste regiunea promotor. Această represie necesită activitatea proteinei Spt6 implicată, probabil, și în asamblarea nucleosomului. Eliminarea represiei genei suc2 necesită cel puțin două etape: (b) complexul Swi/Snf remodelează nucleosomii destabilizând cromatina. (c) Ulterior, histonele trebuie modificate sau îndepărtate (după Hartzog și Winston, 1997).

H2A-H2B posedă o funcție esențială ce necesită cel puțin un membru al perechii pentru a dobândi un capăt amino-terminal intact. Capetele amino-terminale ale celor patru histone sunt necesare represiei transcrierii la nivel bazal a genelor *gal1* și *pho5*. În plus, capatul amino-terminal al histonei H2A este necesar transcrierii genei *suc2* (Fig. 50.), iar capetele amino-terminale ale H3 și H4 servesc reglării genelor *gal1, gal7, gal10, pho5*, locusului HM și genelor telomerice. În plus, capetele amino-terminale ale H3 și H4 sunt importante pentru asamblarea *in vitro* și *in vivo* a nucleosomilor.

40.2. FACTORI REGLATORI POZITIVI – COMPLEXUL SWI/SNF DE REMODELARE A NUCLEOSOMILOR

Swi/Snf este un complex proteinic de remodelare/modificare a cromatinei, cu funcționare interdependentă, ce destabilizează cromatina și activează expresia a numeroase gene la drojdii, prin accesul factorilor transcripționali la situsurile de legare, ca urmare a remodelării nucleosomilor de la acest nivel. De exemplu, proteinele Swi reglează transcrierea genei pentru endonucleaza *HO* necesară comutării tipului de împerechere, iar proteinele Snf activează transcrierea genei *suc2* ce codifică invertaza necesară catabolizării sucrozei sau rafinozei.

Complexul proteinic Swi/Snf (g_m de 2 Mdal) este alcătuit din proteinele Swi1, Swi2, Swi3, Snf5 și Snf6 și din cinci polipeptide adiționale : Swp82, Swp73, Swp61, Swp59 și Swp29. Caracterizarea biochimică a arătat că acest complex funcționează prin alterarea structurii nucleosomului, alterare dependentă de hidroliza continuă a ATP și de prezența unor elemente activatoare. Alterarea structurii nucleosomului este pusă pe seama proteinei Swi2, ce conține motive structurale similare helicazelor stimulate de ADN și care reprezintă o ATP-ază ADN-dependentă.

Până în prezent s-au propus mai multe modele de acțiune a complexului Swi/Snf la nivelul nucleosomului (Fig. 51.). Un prim model (Fig. 51.A.) este similar mecanismului de *'spooling'* sugerat pentru progresia polimerazelor de-a lungul nucleosomilor și presupune : funcționarea complexului Swi/Snf ca motor ATP-dependent ce se translocă de-a lungul ADN și destabilizează interacțiile ADN-proteine. În acest model, o proteină de translocare utilizează energia rezultată prin hidroliza ATP pentru a traversa un nucleosom într-o manieră prin care se produce doar distorsionarea parțială a nucleosomului. Factorii transcripționali folosesc această întrerupere tranzitorie la descoperirea țintelor ADN. Acest model al acțiunii Swi/Snf nu explică modul în care acțiunea complexului asupra nucleosomului conduce la remodelarea stabilă a acestuia.

Cel de-al doilea model lansează ideea conform căreia complexul Swi/Snf interacționează cu ADN-ul nucleosomal și utilizează energia rezultată prin hidroliza ATP la alterarea interacției ADN-histone (Fig. 51.B.). Acest complex nu este abundent (100 copii *per* celulă). Maniera în care complexul Swi/Snf țintește poziția cromozomală corectă presupune mai multe

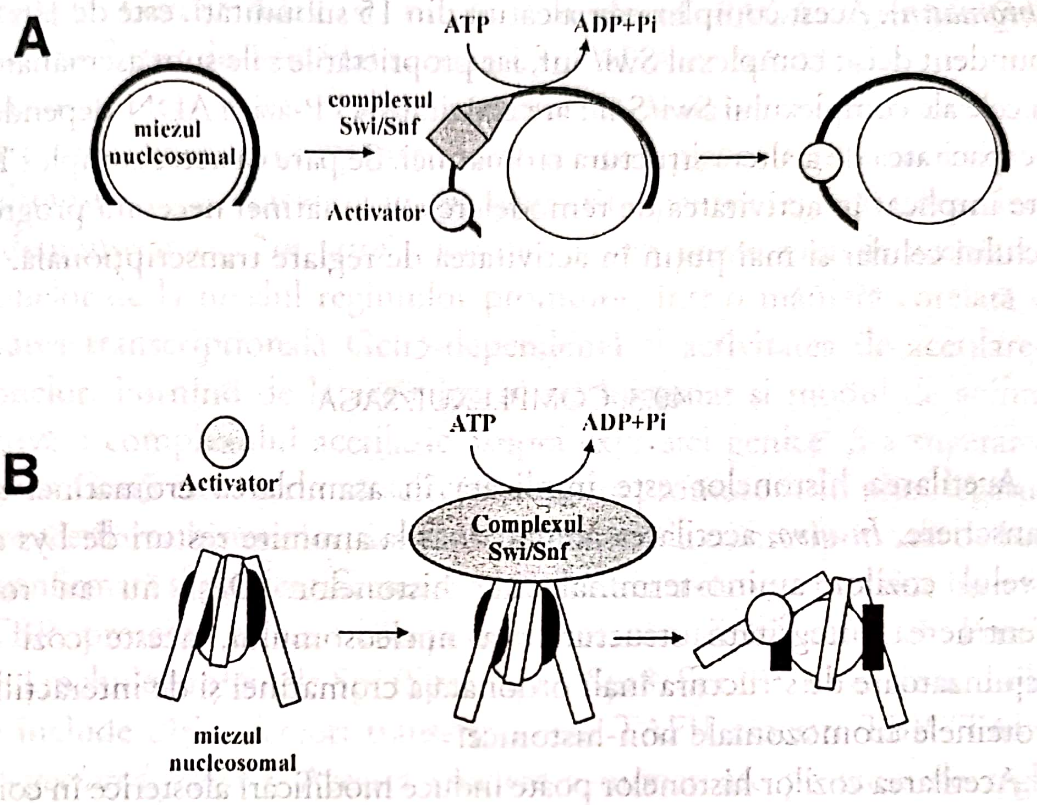


Fig. 51— Modele posibile de acțiune ale complexului Swi/Snf. A. Modelul motorului ATP-dependent: complexul se deplasează de-a lungul ADN asociat nuclezomului folosind energia hidrolizei ATP. Deplasarea are ca rezultat schimbarea poziției ADN față de octamerul histonic. În această conformație o moleculă activator se leagă la ADN. B. Modelul modificării nucleosomului: acțiunea Swi/Snf implică interacția cu nucleosomul, ce are drept consecință apariția unui nucleosom modificat la care activatorii sunt capabili să se lege. Și acest proces este ATP-dependent (după Martin, 1999).

mecanisme ipotetice. Se presupune că acest complex se asociază cu proteine activatoare care îl direcționează către gene specifice, deși se pare că este vorba mai degrabă de contextul cromozomal al situsului de legare a activatorului, ce determină dependența Swi/Snf de transcriere. O altă explicație posibilă este aceea că acest complex este recrutat la promotori o dată cu mașinăria transcripțională. Totuși, o asociere puternică sau stabilă cu holoenzima ARN pol II este discutabilă. Alternativ, se presupune că subunitățile Swi/Snf au o afinitate de legare secvență-specifică la ADN, ce conferă specificitate de promotor.

La drojdii s-a identificat și un al doilea complex capabil să remodeleze structura cromatinei – **complexul RSC** (*Remodeling the Structure of*

Chromatin). Acest complex este alcătuit din 15 subunități, este de 10x mai abundent decât complexul Swi/Snf, iar proprietățile sale sunt asemănătoare cu cele ale complexului Swi/Snf : are activitate ATP-azică ADN-dependentă și capacitatea de a altera structura cromatinei. Se pare că acest complex RSC este implicat în activitatea de remodelare a cromatinei necesară progresiei ciclului celular și mai puțin în activitatea de reglare transcripțională.

40.3. COMPLEXUL SAGA

Acetilarea histonelor este implicată în asamblarea cromatinei și în transcriere. *In vivo*, acetilarea are loc doar la anumite resturi de Lys de la nivelul cozilor amino-terminale ale histonelor. Deși nu au rol în menținerea integrității structurale a nucleosomului, aceste cozi sunt răspunzătoare de structura înalt ordonată a cromatinei și de interacțiile cu proteinele cromozomale non-histonice.

Acetilarea cozilor histonelor poate induce modificări alosterice în conformația nucleosomului și poate inhiba supraîmpachetarea nucleosomilor, ce sunt represivi la transcriere.

În celulele eucariote s-au descris două acetiltransferaze HAT majore (HAT - *Histone AcetylTransferase*) : enzima citoplasmatică HAT-B, implicată în acetilarea histonei H4 din ADN replicat, și enzima nucleară HAT-A, responsabilă de acetilarea asociată transcrierii.

La *S.cerevisiae*, HAT-B este alcătuită din doua polipeptide : subunitatea catalitică Hat1 și subunitatea Hat2, componentă a factorului CAF1 de asamblare a cromatinei (CAF1 – *Chromatin Assembly Factor 1*).

Proteina HAT-A este codificată de gena *gcn5*. Proteina HAT-A (Gcn5), împreună cu proteinele Ada2 și Ada3, formează un complex denumit **complex ADA**. Proteina Gcn5 are activitate histon-acetilazică și este capabilă să acetileze histone libere la resturile de Lys din poziții specifice (K14 în histona H3, și K8, K16 în histona H4), diferite de cele folosite de HAT-B citoplasmatică pentru depunerea și asamblare nucleosomilor (K5, K12 în histona H4). Cu toate acestea, *in vitro*, proteina Gcn5 este incapabilă să acetileze histone deja asamblate în nucleosom. Direcționarea Gcn5 în acetilarea nucleosomilor este pusă pe seama a două complexe, ce conțin proteinele Gcn5, Ada2 și Ada3: **complexul SAGA** (*Spt/Ada/Gcn5 acetyltransferase*) de 1.8Mdal și complexul ADA de 0.8 Mdal.

Datele recente de analiză mutațională arată că nucleosomii sunt substraturi fiziologice pentru aceste complexe și că activitatea acetiltransferazică reprezintă un element critic pentru reglajul transcrierii. S-a demonstrat că, "*in vitro*", acțiunea Gcn5 crește rata de acetilare a hictonelor de la nivelul regiunilor promotor, într-o manieră corelată cu activarea transcripțională Gcn5-dependentă și activitatea de acetilare a histonelor. Pornind de la acest lucru, s-a imaginat și modul de acțiune selectivă a complexului acetilazic asupra expresiei genice. S-a sugerat că proteina Gcn5 este recrutată selectiv de către promotori. În plus, legătura dintre acetilarea histonelor, activatori și mașinăria transcripțională de bază este confirmată și de identificarea și caracterizarea a câtorva proteine înrudite cu TBP, proteine ce sunt componente ale complexului SAGA. Primul grupul include proteinele Spt (Spt3, Spt7, Spt8, Spt20), iar ce de-al doilea grup include câțiva factori transcripționali TAFII asociați TBP (TAF – *TBP-asociated factors*). Această asociere a numeroase proteine de reglaj transcripțional conferă complexului SAGA abilitatea de a răspunde la o gamă largă de stimuli și de a interacționa cu numeroși activatori, cu posibilitatea reglării unui spectru larg de promotori.

40.4. INTERACȚII GENETICE ÎNTRE DIFERITELE COMPLEXE

În principiu, toate aceste complexe ce acționează pentru a impiedica contactele dintre histonele nucleosomale și ADN activează expresia genică. Astfel, analizele genetice indică funcționarea combinată a produșilor Ada/Gcn5 cu complexul Swi/Snf. De exemplu, produșii Ada/Gcn5 sunt necesari expresiei a numeroase gene dependente de Swi/Snf (genele *ho, suc2* și *ino1*), iar activitățile conbinate ale Gcn5 și Swi/Snf sunt importante pentru gena *adh2*, ambele complexe fiind implicate în funcționarea activatorului Gcn5. De asemenea, complexele SAGA și Swi/Snf intercaționează funcțional, această interacție fiind necesară menținerii stabilității Swi/Snf.

Interacții genetice de tip antagonist s-au descris și între mediatorul Srb și complexele Swi/Snf. Acestea funcționează pe căi paralele. În fine, la acestea se adaugă interacțiile dintre complexul SAGA și mediatorul Srb. Aceste interacții nu sunt corelate cu acetilarea histonelor. Complexul SAGA se asociază cu TBP, SAGA conținând două grupe de proteine ce interacționează cu TBP: grupul proteinelor Spt20, Spt3 și Ada2 și grupul factorilor TAFII.

40.5. MODELUL INTERACȚIEI GENETICE A COMPLEXELOR

Interacțiile genetice propun un model în trei pași, corespunzător diferitelor activități de remodelare a cromatinei (Fig. 52.). Deoarece complexul SAGA se leagă la domeniile acide de activare, acest model sugerează că SAGA este implicat in țintirea altor complexe de tipul complexului Swi/Snf ce interacționează cu proteine activatoare specifice. În plus, activitatea acetilazică a complexului SAGA poate deteriora structurile înalt ordonate, prin slăbirea abilității cozilor histonice acetilate de a menține aceste structuri, permitând accesul complexului activator Swi/Snf la matrița nucleosomală. Interacția Swi/Snf cu proteinele histonice sau non-histonice, precum Sin1, produce un spectru complex de modificări în structura cromatinei. Asamblarea și atașarea complexului transcripțional ARNpolII la nivelul cromatinei relaxate are drept consecință, prin acțiunea mediatorului Srb conținut, dislocarea nucleosomilor și inițierea transcrierii.

Pentru inițierea transcrierii, nu toți promotorii au nevoie de toate activitățile prezente în numeroasele complexe, necesitatea uneia din aceste activități reflectând contextul cromozomal în care află promotorul. De asemenea, un singur complex poate participa în mai multe etape. De exemplu, complexul SAGA într-o primă etapă deschide structura cromatinei prin acetilarea cozilor histonice, dar poate fi implicat în același timp și în etapele ulterioare, deoarece este alcătuit din proteine de tipul Spt și TAFII, capabile să interacționeze cu mașinăria transcripțională.

40.6. RECRUTAREA ȘI ASAMBLAREA COMPLEXULUI DE TRANSCRIERE

Preinițierea și inițierea transcrierii direcționate de holoenzima ARN polII este un proces multietapizat ce necesită interacții coordonate între proteine de tip: factori transcripționali generali, asamblați în proximitatea situsului Start al transcrierii, activatori legați la secventele *enhancer* plasate distal față

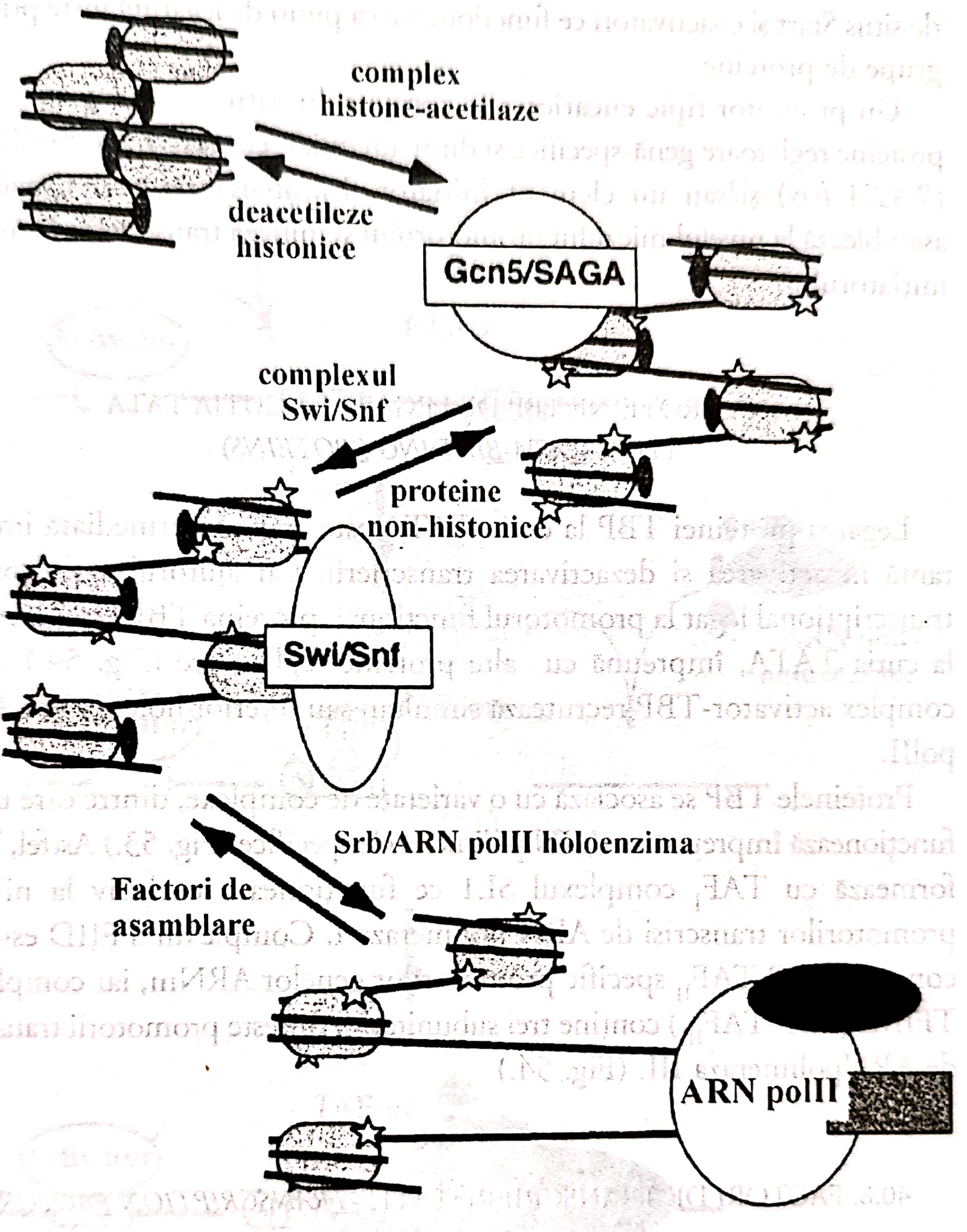

complex
histone-acetilaze
deacetileze
histonice
Gcn5/SAGA
complexul
Swi/Snf
proteine
non-histonice
Swi/Snf
Srb/ARN polII holoenzima
Factori de
asamblare
ARN polII

Fig. 52 — Modelul remodelării cromatinei într-un promotor de drojdie. Histon-acetilazelor din complexul SAGA, ce conține Gcn5, acetilează cozile histonelor și întrerup interacțiile responsabile de conformația inițial compactată. Această cromatină relaxată este ținta complexului Swi/Snf ce acționează la nivelul nucleosomilor individuali. În plus, factori accesorii precum proteina Sin1 pot fi îndepărtați. În final, complexul ARNpolII, ce conține complexul mediator – Srb, îndepărtează nucleosomii și permite inițierea transcrierii (după Martin, 1999).

de situs Start și coactivatori ce funcționează ca punți de legatură între primele grupe de proteine.

Un promotor tipic eucariot este compus din situsuri de legare pentru proteine reglatoare genă-specifice și dintr-un ,miez' compus din cutia TATA (*TATA box*) și/sau un element inițiator. Mașinăria transcripțională se asamblează la nivelul miezului promotorului și inițiază transcrierea la nivelul inițiatorului.

40.7. PROTEINE TBP DE LEGARE LA CUTIA TATA (TBP –*TATA-BINDING PROTEINS*)

Legarea proteinei TBP la cutia TATA este etapa intermediară importantă în activarea și dezactivarea transcrierii. Cu ajutorul activatorului transcripțional legat la promotorul funcțional, proteina TBP este recrutată la cutia TATA, împreună cu alte proteine reglatoarre (Fig. 54.) Acest complex activator-TBP recrutează simultan sau ulterior holoenzima ARN polII.

Proteinele TBP se asociază cu o varietate de complexe, dintre care unele funcționează împreună cu ARN polimerazele specifice (Fig. 53.) Astfel, TBP formează cu TAF_I complexul SL1 ce funcționează exclusiv la nivelul promotorilor transcriși de ARN polimeraza I. Complexul TFIID este un complex $TBP\text{-}TAF_{II}$ specific promotorilor genelor ARNm, iar complexul TFIIIB ($TBP\text{-}TAF_{III}$) conține trei subunități și ţinteste promotorii transcriși de ARNpolimeraza III. (Fig. 54.)

40.8. FACTORI DE TRANSCRIERE TF (TF-*TRANSCRIPTION FACTOR*)

La eucariote, inclusiv drojdii, factorii de transciere sunt specifici fiecărui tip de ARN polimerază, astfel că aceștia se clasifică în: (1) factori transcripționali de tip I (TFI) – factori specifici pentru ARN polimeraza I ce polimerizează ARNr 5.8S, 18S și 28S, (2) factori generali de transcriere sau de tip II (TFII) asociați ARN polimerazei II ce determina sinteza ARNmesager (ARNm) și (3) factori transcripționali de tip III (TFIII) –

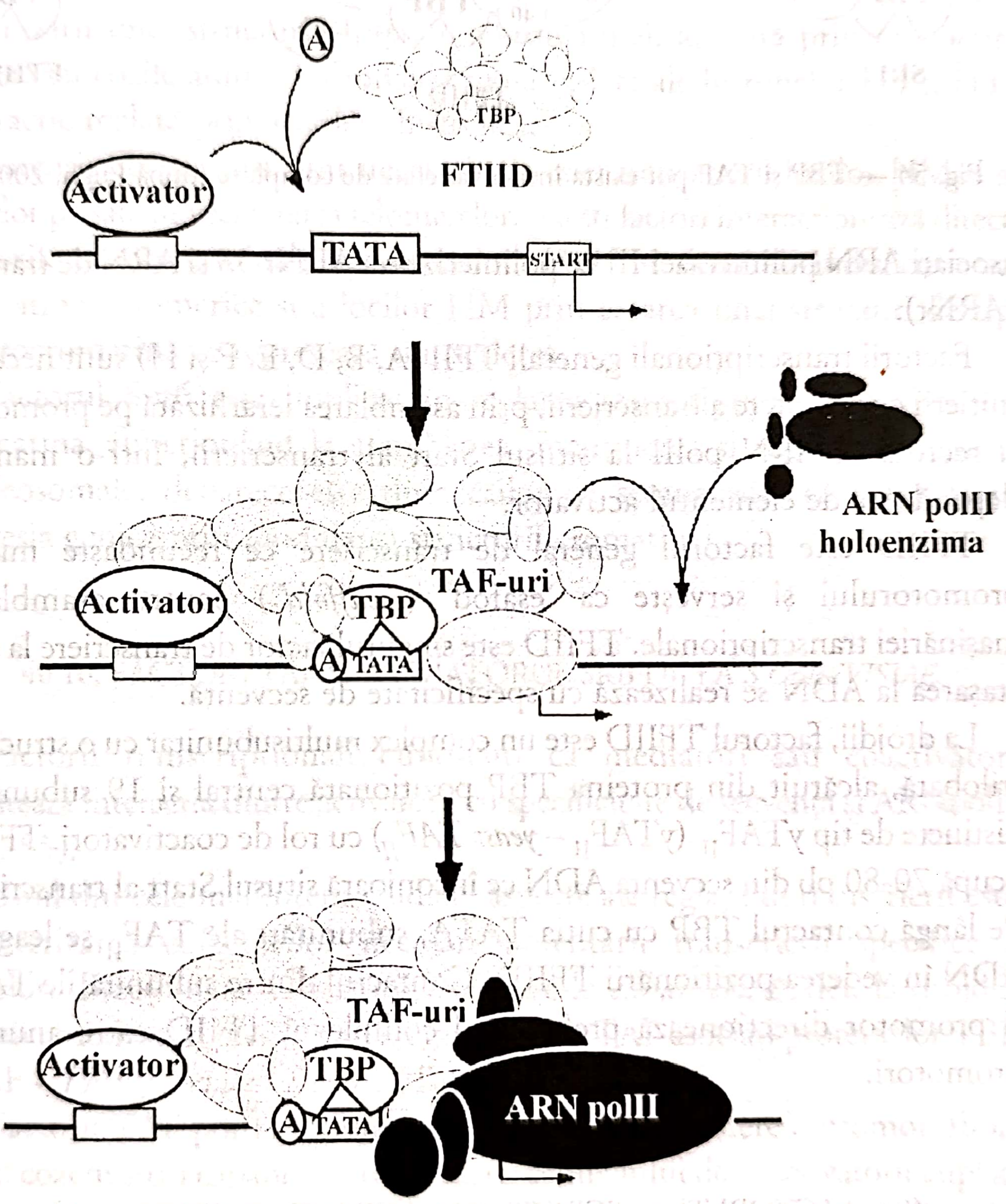

A
TBP
FTIID
Activator
TATA
START
ARN polII
holoenzima
TAF-uri
Activator
TBP
A
TATA
TAF-uri
Activator
TBP
A
TATA
ARN polII

Fig. 53 — Reprezentarea schematică a celor două etape majore în asamblarea complexului transcripțional. Activatorii se leagă la situsurile specifice din promotor și recrutează factorul transcripțional TFIIA (A) și complexul TFIID (TBP-TAFII) la miezul promotorului. Acest complex permite ulterior legarea holoenzimei ARN polII (după Pugh, 2000).

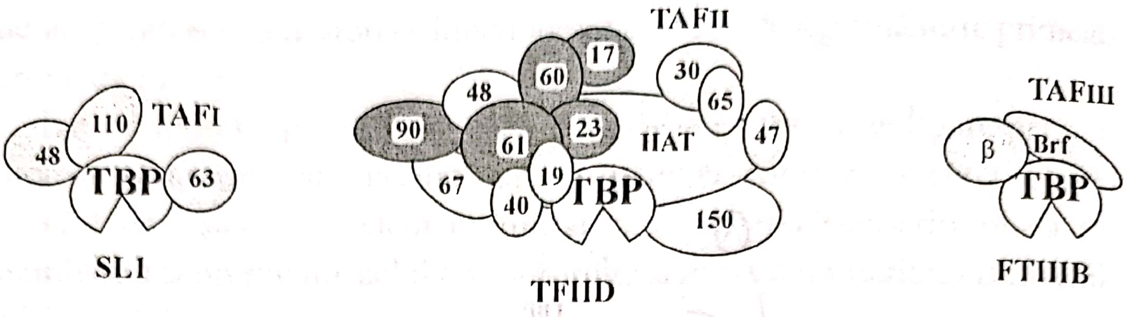


Fig. 54 — TBP și TAF pot exista într-o varietate de complexe (după Pugh, 2000)

asociați ARN polimerazei III ce polimerizează ARNr 5S și ARN de transfer (ARNt).

Factorii transcripționali generali TFII (A, B, D, E, F și H) sunt necesari inițierii cu acuratețe a transcrierii, prin asamblarea ierarhizată pe promotori și recrutarea ARN polII la situsul Start al transcrierii, într-o manieră dependentă de elementul activator.

TFIID este factorul general de transcriere ce recunoaște miezul promotorului și servește ca 'eșafod' ("*scaffold*") pentru asamblarea mașinăriei transcripționale. TFIID este singurul factor de transcriere la care atașarea la ADN se realizează cu specificitate de secvență.

La drojdii, factorul TFIID este un complex multisubunitar cu o structură trilobată, alcătuit din proteina TBP poziționată central și 19 subunități distincte de tip $yTAF_{II}$ ($yTAF_{II}$ – *yeast* TAF_{II}) cu rol de coactivatori. TFIID ocupă 70-80 pb din secvența ADN ce înconjoară situsul Start al transcrierii. Pe lângă contactul TBP cu cutia TATA, subunități ale TAF_{II} se leagă la ADN în vederea poziționării TFIID. Contactul dintre subunitățile TAF_{II} și promotor direcționează preferențial complexul TFIID către anumiți promotori.

40.9. FACTORI TRANSCRIPȚIONALI CE INTERACȚIONEAZĂ DIRECT CU HISTONELE

La *S.cerevisiae* s-a demonstrat existența unor factori transcripționali ce interacționează direct cu histonele, prin alterarea structurii cromatinei. Din acest set de factori fac parte: factorii Tup1, Ssn6, Sir3, Sir4 și Spt6.

Factorii Ssn6 și Tup1 formează un complex proteinic ce represează transcrierea a numeroase gene, fie prin legarea directă la ADN, fie prin atașarea lor la promotori, ca urmare a asocierii cu proteine specifice de legare la ADN. Represia transcrierii de către acesti doi factori este pusă pe seama organizării unei structuri represate a cromatinei, apărută prin interacție directă cu cozile amino-terminale hipo-acetilate ale histonelor H3 și H4, interacție reglată prin acetilare histonică.

Factorii Sir3 și Sir4 sunt necesari represiei transcrierii locilor HM și a genelor plasate în vecinătatea telomerelor. Acești factori interacționează direct cu cozile amino-terminale ale histonelor H3 și H4, determinând silențierea cromatinei telomerice și a locilor HM prin crearea unei structuri de tip heterocromatină ce represează transcrierea.

Factorul Spt6 este implicat în reglarea transcripțională mediată de cromatină, funcționând la asamblarea, menținerea și reglarea structurii nucleosomale, deoarece este ținta căilor de semnalizare ce controlează expresia genică prin modularea structurii cromatinei.

40.10. FACTORI TAF ȘI MEDIATORUL SRB DE LA *S. CEREVISIAE*

Factorii transcripționali cunoscuți ca mediatori sau coactivatori facilitează interacția dintre activatorii cu specificitate de secvență și ARNpolII (Fig. 55).

Unul din cele mai intens studiate aspecte ale reglajului transcrierii este caracterizarea cofactorilor necesari potențării transcrierii specifice a genelor, direcționată de factorii de legare la *enhanceri*. Astfel, la drojdii, primii coactivatori identificați au fost factorii TAF asociați proteinelor TBP (TAF - *TPB-associated factors*) (Tabel 4.).

Factorii TAF pot funcționa ca factori de recunoaștere a promotorilor, fiind coactivatori capabili de transducția semnalului de la activatorii cuplați la *enhanceri* către mașinăria transcripțională, cât și ca modificatori enzimatici ai altor proteine.

Cel puțin 7 subunități yTAF$_{II}$ posedă plieri de tip *histone-like*. Dintre acestea, yTAF$_{II}$17 și yTAF$_{II}$60 formează un heterotetramer echivalent structural al tetramerului histonic H3-H4. yTAF$_{II}$48 și yTAF$_{II}$68 heterodimerizează și sunt înrudite structural cu histonele H2A și H2B. În

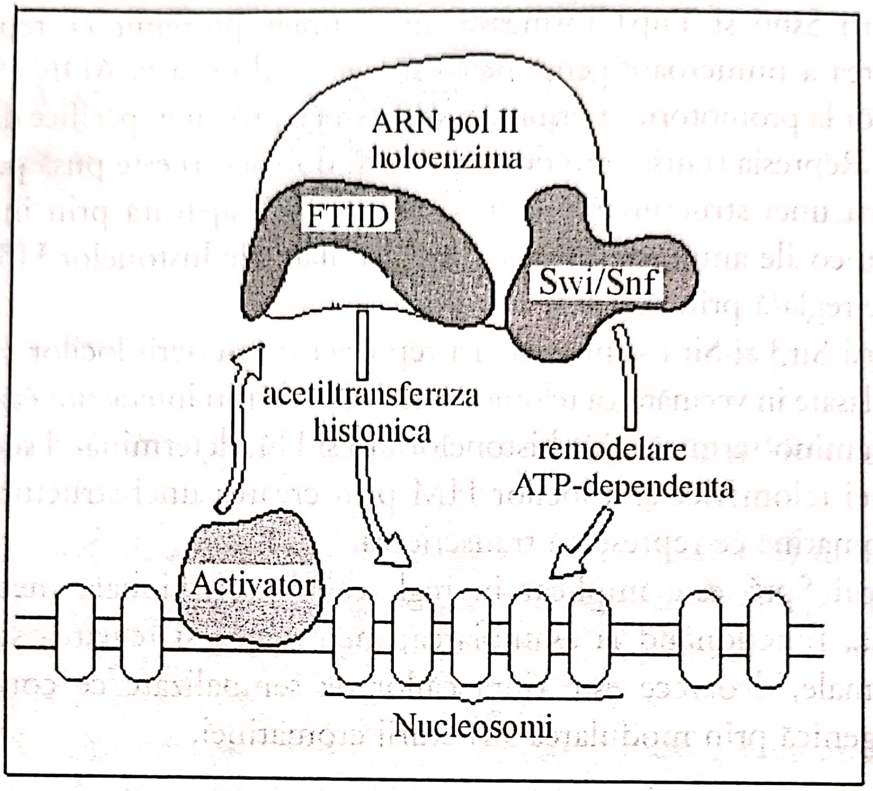


Fig. 55 — Enzimele de remodelare a cromatinei pot fi recrutate de către activator la promotor, împreună cu holoenzima ARN polII. yTAF$_{II}$145 posedă activitate acetiltransferazică. De asemenea, complexul Swi/Snf de remodelare a cromatinei poate fi prezent ca parte componentă a holoenzimei. Aceste proteine sunt implicate în dezasamblarea cromatinei, ce are loc înainte de recrutarea holoenzimei la promotor (după Greenblatt, 1997).

plus, multe dintre aceste perechi de tip *histone-like* interacționează reciproc, iar yTAF$_{II}$90 este o componentă integrală a complexului SAGA de remodelare a cromatinei.

Subunitatea yTAF$_{II}$145 din TFIID este o acetiltransferază histonică, al cărei echivalent funcțional în complexul SAGA este proteina Gcn5. Bazat pe aceasta, se pare că TFIID și complexul SAGA reprezintă complexe similare din punct de vedere funcțional, fiecare prezentând roluri distincte și posibil suprapuse în controlul expresiei genelor. Fiecare subunitate TFIID- sau SAGA-specifică este direcționată către seturi diferite de promotori, în vreme ce interacțiile cu subunitățile comune poate conduce la recrutarea celuilalt complex.

Tabel 4. Subunitățile yTAF$_{II}$ ale TFIID la drojdii (după Pugh, 2000).

Subunitatea	Interacții	Alte proprietăți
150	ADN	
TSM1	activatori	
145	TBP	Stabilizează interacția TBP-cutia TATA
130	TAF	Protein-kinază
Bdf1/2	TFIIF, histone, ciclina D1	Acetiltransferază, protein-kinază Conține domenii de legare la cozile acetilate ale histonei H4
90	complexul SAGA, TFIIF	
68	TBP	Histona H2B-like
61	complexul SAGA, TBP	Histona H2B-like
67	activatori, TAF	
65	?	?
60	complexul SAGA,TAF$_{II}$17	Histona H4-like
48	TAFII68	Histona H2A-like
Tsg2	TFIIA, TAF$_{II}$145	Coactivator pentru anumiți activatori
47	?	?
40		Histone-like
30	TFIIF, complexul Swi/Snf	Coactivator pentru receptori
25	complexul SAGA	
19		Histona H4-like
17	complexul SAGA, activatori	Histona H3-like

Acetiltransferazele histonice au capacitatea ca, prin acetilare, să determine neutralizarea încărcăturii pozitive a resturilor de Lys de la nivelul cozilor histonice amino-terminale. Consecința directă a acestei modificări este reprezentată de decondensarea și creșterea accesibilității la nivelul cromatinei. De asemenea, anumite *pattern*-uri de acetilare histonică sunt recunoscute de $yTAF_{II}145$. Prin urmare, acetilarea histonelor de la nivelul promotorilor proximali facilitează atașarea TBP mediată de $yTAF_{II}145$ la aceștia. În plus, $yTAF_{II}145$ serveste ca 'eșafod central' de asamblare a subunităților TAFIID.

Pe lângă activitatea de acetiltransferază, yTFIID posedă și două protein-kinaze reprezentate de $yTAF_{II}130$ și Bdf1/2. Acestea fosforilează atât TFIID, cât și factorul de transcriere general TFIIF.

Factorul transcripțional general TFIID de la drojdii este un complex multi-component alcătuit din 8-12 factori TAF și proteina TPB. În contrast cu mediatorul Srb, factorii TAF sunt necesari doar pentru transcrierea dependentă de activator, diferitele subunități TAF ale factorului TFIID interacționând direct și selectiv cu domenii distincte ale activatorilor. În plus, interacția simultană a diferiților activatori cu factori TAF distincți exercită un efect sinergic asupra activării transcrierii.

Recent, la drojdii, s-a identificat un cofactor denumit **mediator Srb** – complex multiproteinic asociat cu ARN polII. Acest complex conține >30 proteine, dintre care doar câteva au fost identificate: supresorii Srb (Srb – *Suppressors of RNA polymerase B*), Gal11, Sin4, Rgr1 și complexul Swi/Snf. Unele componente ale complexului mediator (de exemplu: Srb) formează un ansamblu care se leagă la domeniul carboxi-terminal al subunității mari a ARN polII (Fig.56.)

Atașarea proteinei TBP la nivelul cutiei TATA reprezintă o etapă intermediară în activarea transcrierii. Cei 180 de aminoacizi de la nivelul domeniul carboxi-terminal al TBP formează o ‚șa' care se leagă cu afinitate mărită la adâncitura minoră a ADN de la nivelul cutiei TATA. De asemenea, acest domeniu leagă activatorii, factorii TAF asociați TBP, represorii și factorii de transcriere generali.

Cu ajutorul unui activator transcripțional funcțional, legat cu specificitate de secvență la elementele *enhancer* localizate înaintea ("*upstream*") miezului promotorului, proteina TPB este recrutată la cutia TATA, împreună cu alte proteine reglatoare (TFIIB, TFIIE, TFIIF și TFIIH). Ulterior, complexul activator – TPB recrutează holoenzima ARN polII, permitând acesteia să inițieze transcrierea (Fig. 56. și 57.).

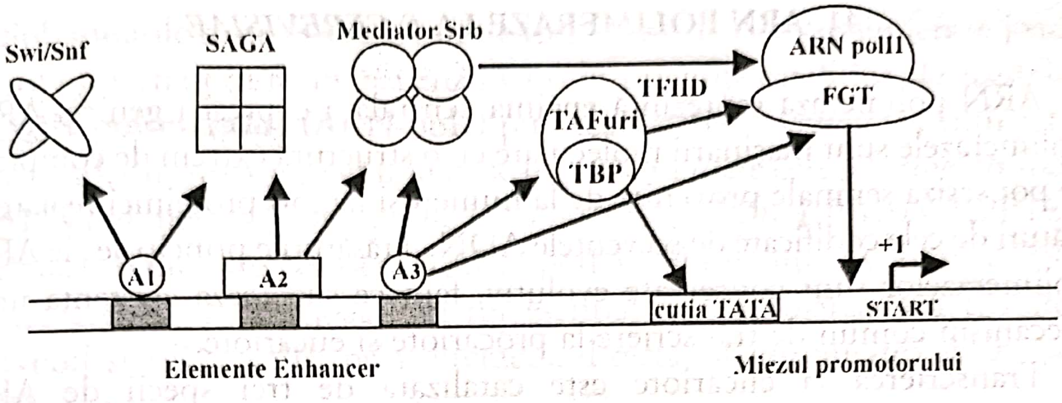

Swi/Snf
SAGA
Mediator Srb
ARN polII
FGT
TFIID
TAFuri
TBP
A1
A2
A3
+1
cutia TATA
START
Elemente Enhancer
Miezul promotorului

Fig. 56 — Cofactori implicați în activarea transcrierii la *S.cerevisiae.* Proteinele activator (A1,A2, A3) se leagă la *enhanceri* și interacționează direct cu cofactori și/sau componentele mașinăriei transcripționale (ARNpolII și factorii generali de transcriere). Coactivatorii prezentați sunt: complexul Swi/Snf de remodelare a cromatinei, complexul SAGA (acetilaze histonice), mediatorul Srb și subunitatea TAF a TFIID. Mediatorul Srb interacționează direct prin domeniul carboxi-terminal cu ARNpolII, cu formarea unui complex de tip holoenzimă (după Wu și Hampsey, 1999).

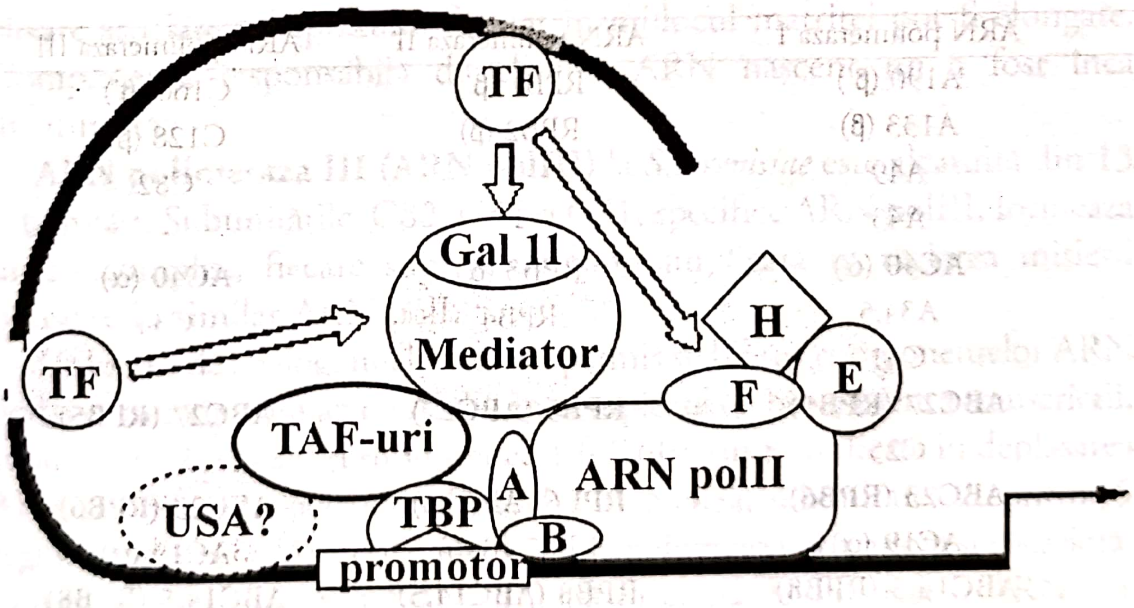

TF
Gal 11
Mediator
H
TF
F
E
TAF-uri
ARN polII
A
USA?
TBP
B
promotor

Fig. 57 — Mecanismul activării transcripționale la *S.cerevisiae.* Pentru activarea transcrierii, factorii transcripționali interacționează cu componentele complexului mediator, precum Gal11. Interacțiile dintre activatori și factorii de transcriere de bază contribuie la activarea transcrierii (după Sauer și Tijian, 1997).

41. ARN POLIMERAZE LA *S.CEREVISIAE*

ARN polimeraza reprezintă enzima centrală a expresiei genice. ARN polimerazele sunt mașinării moleculare cu o structură extrem de complexă ce pot sesiza semnale provenite de la numeroși factori proteinici reglatori, alături de cele codificate de secvențele ADN. Trăsăturile principale ale ARN polimerazelor sunt conservate evolutiv, fapt ce sugerează existența unui mecanism comun de transcriere la procariote și eucariote.

Transcrierea la eucariote este catalizată de trei specii de ARN polimeraza : ARN polimeraza I pentru sinteza ARNr, ARN polimeraza II pentru sinteza ARNm și ARN polimeraza III pentru sinteza ARNt și ARNr 5S. Fiecare ARN polimerază este alcătuită din mai mult de 10 polipeptide diferite. Până în prezent nu este cunoscut setul minim și esențial de polipeptide ce constituie miezul enzimei responsabil de activitatea catalitică a polimerizării ARN (Tabel 5.).

Tabel 5. Subunitățile ARN polimerazelor la *S.cerevisiae*. Subunitățile prezentate în paranteză reprezintă omologii de la *E.coli* (după Ishihama și colab., 1998).

ARN polimeraza I	ARN polimeraza II	ARN polimeraza III
A190 (β’)	RPB1 (β’)	C160 (β’)
A133 (β)	RPB2 (β)	C128 (β)
A49	-	C82
A43	-	-
AC40 (α)	RPB3 (α)	**AC40 (α)**
A34.5	RPB4	C34
C31		
ABC27 (RPB5)	**RPB5 (ABC27)**	**ABC27 (RPB5)**
C25		
ABC23 (RPB6)	**RPB6 (ABC23)**	**ABC23 (RPB6)**
AC19 (α)	RPB7 (B16)	**AC19 (α)**
ABC14.5 (RPB8)	**RPB8 (ABC14.5)**	**ABC14.5 (RPB8)**
A14	RPB9 (α)	-
A12.2	RPB11 (α)	-
ABC10β (RPB10)	**RPB10 (ABC10β)**	**ABC10β (RPB10)**
ABC10α (RPB12)	**RPB12 (ABC 10α)**	**ABC10α (RPB12)**

Subunitățile ce se regăsesc în cele trei forme de ARN polimeraze joacă un rol important în formarea enzimei și în funcțiile catalitice ale acesteia.

ARN polimerazaI (ARN polI) purificată de la *S.cerevisiae* conține 14 subunități, dintre care 5 subunități se regăsesc în toate cele 3 forme posibile de ARN polimeraze (subunitățile RPB5, RPB6, RPB8, RPB10 și RPB12), iar două subunități se regăsesc la ARN polIII (subunitățile AC40 și AC19). Dintre acestea, RPB6 joacă un rol esențial în asamblarea și activitatea ARNpolI și ARN polII, prin interacția directă cu subunitatea A190 sau RPB1.

ARN polI conține și 7 subunități care nu se regăsesc în celelalte două specii moleculare. Subunitățile specifice nu sunt necesare funcțiilor catalitice implicate în polimerizarea ARN. Subunitatea A34.5 este implicată în activarea promotorului ARNr prin controlul superrăsucirilor ADN.

Activitatea de RN-ază este asociată cu ARN polI. Până în prezent au fost descrise două forme ale complexului de transcriere implicate în clivajul ARN nascent: o formă ia naștere la capătul matriței și cealaltă formă rezultă prin îndepărtatea substratului nucleotidic în timpul elongării lantului ARN. Ambele forme prezintă o activitate de clivare a ARN nascent în poziția 10-14 față de capetele 3' ale ARN. Până la adăugarea substraturilor, fragmentele clivate asociate complexului format în mijlocul matriței pot fi elongate. Componenta responsabilă de clivarea ARN nascent nu a fost încă identificată.

ARN polimeraza III (ARN polIII) la *S.cerevisiae* este alcătuită din 13 subunități. Subunitățile C82, C34 și C31, specifice ARN polIII, formează un subcomplex, fiecare subunitate fiind implicată în reglarea inițierii transcrierii, similar ARN polI.

Utilizarea de analogi nucleotidici a permis stabilirea componentelor ARN polIII ce intră în contact cu ADN. În complexul de pre-inițiere a transcrierii, subunitatea 2 (C128) și subunitatea 1 (C160) sunt implicate în deplasarea ARN sau refacerea matriței ADN. De asemenea, subunitatea 2 conține 5 regiuni desemnate A-I, conservate la ARN polimeraza procariotă și eucariotă. Dintre acestea, regiunea B-C participă în etapa de eliberare a ARN, iar regiunea F interacționează cu lanțurile ARN nascente. Regiunea F este implicată în tranziția către complexul de elongare a transcrierii.

ARN polimeraza II (ARN polII) la *S.cerevisiae* conține 12 polipeptide desemnate ca subunitatea 1 (RPB1) –12 (RPB12). Subunitățile

RPB4 și RPB7 pot fi îndepărtate fară a afecta funcția catalitică a polimerizării ARN.

Analizele de cristalografie bi-dimensională au relevat faptul că domeniul carboxi-terminal mobil (domeniu CTD – *C-terminal domain*) al subunității RPB1 este localizat în interiorul extensiei de tip *finger-like* a structurii tridimensionale a ARN polII. De asemenea, aceleași analize au arătat că, în absența subunităților RPB4 și RPB7, ARN polII se găseste într-o stare 'deschisă' ce permite intrarea ADN-ului, similar holoenzimei de la *E.coli*, iar prin legarea celor două subunități enzima este convertită la starea 'închisă', ce reprezintă forma pe care o ia enzima în timpul elongării transcrierii.

Activitatea ARN polII este reglată prin fosforilarea și defosforilarea domeniului CTD al subunității RPB1. Fosfataza CTD de la *S.cerevisiae*, similar cu cea umană, exprimă o specificitate strictă de substrat, cu activitate de defosforilare a ARN polII omologe. Activitatea de defosforilare crește în prezența factorului general de transcriere TFIIF. Conform acestei ipoteze, după terminarea transcrierii, TFIIF se leagă la ARN polII și stimulează defosforilarea domeniului CTD, având ca rezultat stimularea recrutării ARN polimerazei la nivelul promotorilor.

Complexul holoenzima ARN polII

ARN polII posedă o activitate intrinsecă de clivare a ARN nascent deși, ca și în cazul ARN polI, este încă neclar care subunitate este responsabilă de această activitate.

Similar complexului $\alpha_2\beta\beta'$ (miezul enzimei) al ARN polimerazei procariote (RNAP), miezul ARN polII de la drojdii este un complex compus din subunități de tip *α-like* și *β-like*. La acestea se adaugă o serie de proteine accesorii ce interacționează direct cu ARN polII, incluzând aici factorii generali de transcriere TFIIB, TFIIE, TFIIF și TFIIH, complexele Srb, complexele Swi/Snf, componentele de recombinare și reparare, ca și factorii de procesare ARN. Majoritatea acestor proteine accesorii interacționează cu domeniul CTD al subunității mari și astfel modulează funcțiile ARN polII (Fig. 58).

Similar RNAP bacteriene, ARN polimerazele eucariote sunt incapabile să inițieze transcrierea promotor-specifică. Specificitatea de promotor a ARN polII este conferită de factorii generali de transcriere TBP, TFIIB, TFIIE, TFIIF și TFIIH. Acești factori sunt conservați ca structură și funcție la toate eucariotele și reprezintă omologi ai factorilor σ asociați miezului RNAP,

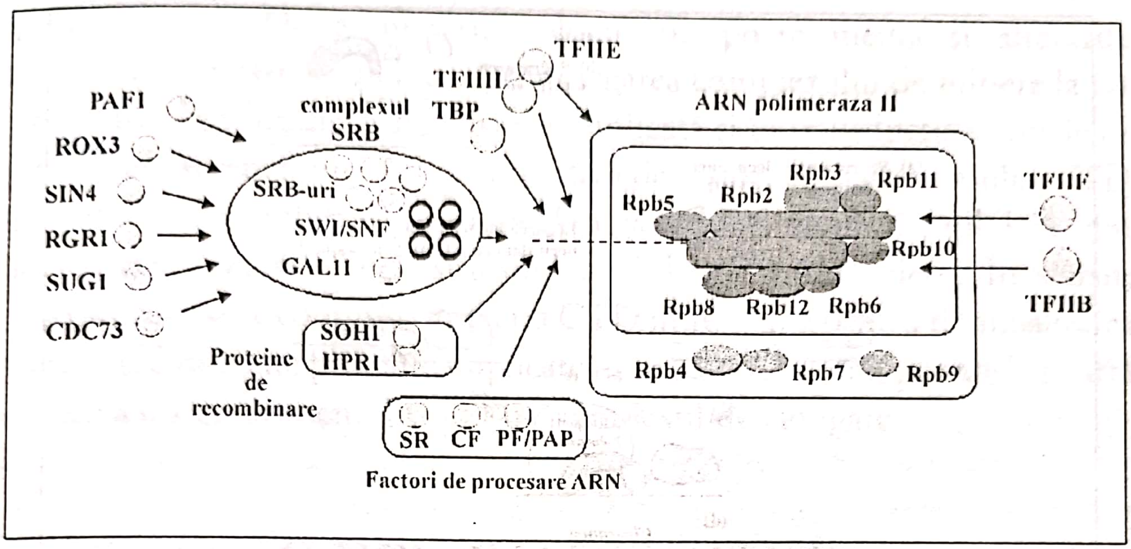

TFIIE
TFIIH
TBP
complexul SRB
ARN polimeraza II
PAF1
ROX3
SIN4
RGR1
SUG1
CDC73
SRB-uri
SWI/SNF
GAL11
Rpb5
Rpb2
Rpb3
Rpb11
Rpb10
Rpb8
Rpb12
Rpb6
TFIIF
TFIIB
SOH1
HPR1
Proteine de recombinare
Rpb4
Rpb7
Rpb9
SR
CF
PF/PAP
Factori de procesare ARN

Fig. 58 — Complexul ARN polII holoenzima la *S.cerevisiae* (după Sebastia și Keller, 1999).

cu care acesta formează complexul holoenzimă ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$) capabil de inițierea cu acuratețe a transcrierii de la nivelul promotorilor ADN.

Deși factorii de transcriere generali și ARNpolII se pot asambla *in vitro* la nivelul promotorului într-o manieră ordonată și etapizată, inițierea transcrierii implică în mod normal legarea la promotor a unui complex de tip **holoenzimă** pre-asamblat, ce conține ARNpolII, TPB și toți factorii de transcriere esențiali inițierii transcrierii (TFIIB, TFIIF și TFIIH). Maniera de recrutare a holoenzimei la nivelul promotorului este discutabilă. Unele date experimentale sugerează recrutarea TBP și a TFIID ca părți componente ale holoenzimei (Fig. 60.a). În acest caz, interacția unui activator cu componentele holoenzimei poate determina legarea acesteia la promotor și creșterea nivelului transcrierii. Alte observații arată că un activator poate determina recrutarea la promotorul ADN a TFIIA și a factorului TFIID de recunoaștere a promotorului. În acest ultim caz, activarea transcrierii se desfășoară în două etape: recrutarea TFIID și TFIIA și, ulterior, recrutarea complexului holoenzima (Fig. 59. b și c).

O dată holoenzima legată la promotor și inițierea transcrierii de către ARN polII, TFIID și TFIIA rămân legați la nivelul promotorului. Reasamblarea complexului de preinițiere se poate realiza pe una din cele două căi posibile: prima cale implică legarea unui complex holoenzimă lipsit de TFIID (Fig 59.e), iar cealaltă cale implică recrutarea TFIIB și ARN polII. Ambele căi necesită interacția activatorului cu TFIID și/sau TFIIA.

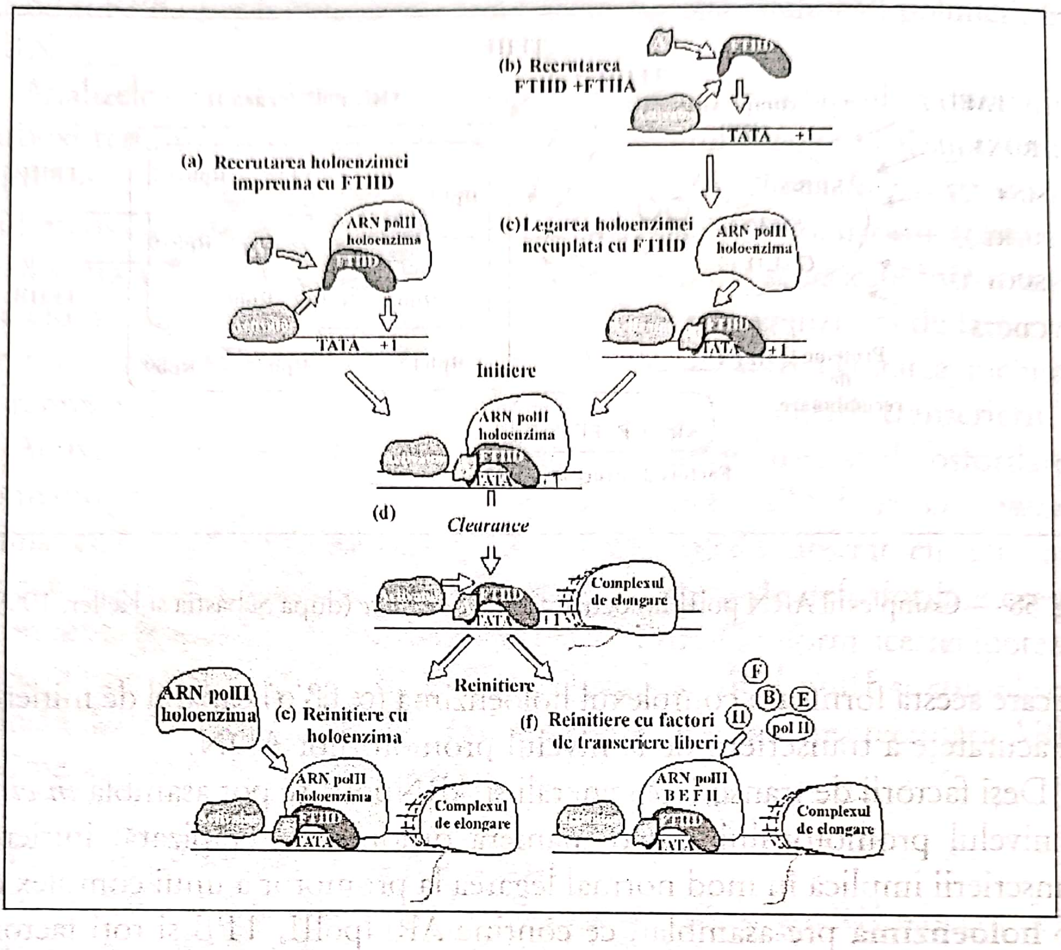

(b) Recrutarea FTIID +FTIIA
TATA +1
(a) Recrutarea holoenzimei impreuna cu FTIID
ARN polII holoenzima
TATA +1
(c) Legarea holoenzimei necuplata cu FTIID
ARN polII holoenzima
TATA +1
Initiere
ARN polII holoenzima
TATA
(d)
Clearance
Complexul de elongare
TATA
Reinitiere
ARN polII holoenzima
(c) Reinitiere cu holoenzima
(f) Reinitiere cu factori de transcriere liberi
F
B
E
II
pol II
ARN polII holoenzima
TATA
Complexul de elongare
ARN polII B E F H
TATA
Complexul de elongare

Fig. 59 — Rolurile posibile ale holoenzimei ARN polII în inițierea și reinițierea transcrierii. (a) Un activator poate recruta la nivelul promotorului holoenzima ce conține factorii esențiali de transcriere, inclusiv TFIID. O cale alternativă pentru inițiere poate implica recrutarea, mai întâi, a TFIID de către activator (b) și ulterior recrutarea holoenzimei (c). (d) TFIID este lăsat în spatele promotorului, de unde poate începe reinițierea transcrierii, fie prin legarea holoenzimei lipsită de TFIID (e), fie prin asamblarea factorilor transcriere și a ARN polII libere (după Greenblatt, 1997).

In vivo transcrierea de către ARN polII poate fi limitată de o serie de factori precum structura cromatinei, recrutarea factorilor generali de transcriere și a ARN polII la promotor, izomerizările ce au loc în complexele de preinițiere parțial sau complet asamblate, *clearance*-ul promotorilor și elongarea lanțului ARN. Proteinele activator stimulează transcrierea prin depășirea uneia sau a mai multor bariere de acest fel.

Date recente arată că holoenzima mediază semnalele de activare și represare ce reglează diferitele etape ale procesului de transcriere. De exemplu, activatorii pot recruta holoenzima sub formă de complex la nivelul promotorului. De asemenea, holoenzima poate media și alterările structurale ale cromatinei, ce permit legarea complexului de inițiere la un promotor. În plus, holoenzima este implicată și în transducția semnalelor de activare și represare ce alterează starea de fosforilare a domeniului CTD și stimulează sau inhibă consecutiv *clearance*-ul și elongarea lanțului ARNm în spatele (“*downstream*”) situsului de inițiere a transcrierii. În sfârșit, holoenzima poate conține o fosfatază CTD importantă pentru terminalizarea transcrierii ca și alte proteine implicate în procesarea ARN, pe care le poartă în asocierea cu domeniul CTD în complexul de elongare.

42. ELONGAREA LANȚULUI ARNm

Sinteza ARNm eucariot este un proces biochimic complex guvernat de acțiunea concertată a diverșilor factori de transcriere ce controlează activitatea ARNpolII atât în faza de inițiere, în cadrul complexului de inițiere a transcrierii, cât și în faza de elongare a transcrierii, la nivelul complexului de elongare a transcrierii.

În cursul elongării transcrierii, ARN polII funcționează ca parte a așa-numitului complex ternar de elongare TEC (TEC- *T̲ernary E̲longation C̲omplex*), în asociere cu matrița ADN și cu transcriptul ARN.

Analiza structurii cristaline a formei catalitic active a ARN polII la *S.cerevisiae* a oferit informații cu privire la arhitectura și proprietățile catalitice ale complexului TEC. Pe baza acestor analize, Cramer și Bushnell au elaborat modelul structural al complexului TEC, conform căruia situsul catalitic al enzimei ARN polII conține un ion de Mg^{2+} plasat la capătul adânciturii formate la interfața subunităților RPB1 și RPB2. Duplexul ADN este acomodat într-o adâncitură formată de subunitatea RPB1, acoperită de subunitatea RPB2. Hibridul ADN-ARN de 8-9 pb este închis într-un canal format de subunitatea RPB1, poziționat în spatele centrului catalitic al enzimei și începutul buclei subunității RPB2. Configurația hibridului în acest canal asigură alinierea corectă a capatului 3’OH a transcriptului nascent la situsul catalitic al enzimei. Dimensiunea restului adânciturii dintre cele două subunități RPB este suficientă pentru acomodarea matriței ADN de ~20pb dincolo de situsul catalitic.

Ionul Mg^{2+} din centrul catalitic marchează și începutul celui de-al doilea canal, care ghidează substratul ADN către centrul activ și acomodează segmentul 3' terminal al ARN monocatenar eliberat. Acest canal secundar este conectat la canalul principal printr-un 'perete' ce îndepărtează ARN-ul din heteroduplex și îl redirecționează către canalul secundar. După separarea de matrița ADN, segmentul 5' liber al ARN monocatenar iese prin canal.

Modelul funcțional al complexului TEC propune existența a trei situsuri cruciale pentru interacția acizi nucleici-proteine de-a lungul traiectoriei matriței ADN prin complex (Fig. 60.). Primul situs este situsul DSB de legare la ADN (DSB - *DNA Binging Site*), plasat în spatele duplexului ADN și care acționează ca o 'rampă de alunecare' ('*sliding clamp*'). Situsul DSB este urmat de situsul HBS de legare a hibridului ADN-ARN (HBS- *Hybrid Binding Site*), care acomodează heteroduplexul ADN-ARN, ale cărui margini constituie cel de-al doilea și al treilea situs de interacție. Prin desfacerea centrului catalitic de pe capătul 3' al ARN, ARN polII alunecă înainte, 'desface' hibridul și eliberează segmentul distal al ARN monocatenar, în timp ce centrul catalitic rămâne aliniat la marginea frontală a hibridului. Pe această bază, porțiunea distală a situsului HBS este denumită 'bucla-fermoar frontală' (FZ- *front zip-lock*). Un mecanism similar operează și la marginea proximală a HBS, unde 'bucla-fermoar dorsală' (RZ-*rear zip-lock*) menține stabilitatea complexului TEC și asigură separarea produsului ARN de matrița ADN în cursul elongării. Ambele bucle-fermoar mențin constantă dimensiunea hibridului (8-9 pb) și a buclei de transcriere (12-13 pb).

Prin structura sa, bucla RZ este implicată în trei funcții importante: separarea catenelor ADN la nivelul marginii proximale a buclei de transcriere, legarea strânsă și îndepărtarea ARN din hibrid.

Proprietățile de bază ale complexului TEC sunt determinate de două tipuri principale de interacții: (1) împerecherea bazelor la nivelul eșafodului reprezentat de acizii nucleici și (2) interacțiile dintre părți distincte ale eșafodului și ARN polII. Formarea heteroduplexului ADN-ARN de 8-9 pb joacă un rol important în menținerea produsului ARN în complexul TEC, împerecherea ARN-ADN contribuind semnificativ la stabilitatea complexului de transcriere. La aceasta se adaugă și interacțiile ARN- și ADN-proteine.

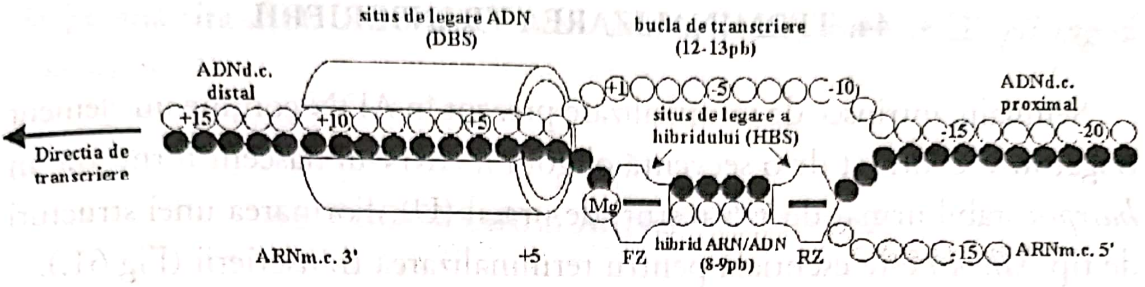

situs de legare ADN
(DBS)
bucla de transcriere
(12-13pb)
ADNd.c.
distal
ADNd.c.
proximal
+15
+10
+5
+1
-5
-10
situs de legare a
hibridului (HBS)
-15
-20
Directia de
transcriere
Mg
ARNm.c. 3'
+5
FZ
hibrid ARN/ADN
(8-9pb)
RZ
15
ARNm.c. 5'

Fig. 60 — Modelul structural-funcțional al complexului de elongare. Structura eșafodului reprezentat de acizii nucleici la nivelul TEC, bazată de configurația și interacțiile cu ARN polII. Se pot distinge cinci părți: (1) duplexul ADN plasat frontal, (2) duplexul ADN plasat dorsal, (3) hibridul ADN-ARN de 8-9 pb, (4) regiunea monocatenară a ADN din bucla de transcriere și (5) ARN monocatenar emergent plasat înaintea hibridului ADN-ARN. Situsul DBS joacă rol de 'rampă de alunecare' ce închide o regiune de 9 pb din duplexul ADN dorsal. Situsul de legare a hibridului, care acomodează heteroduplexul ARN-ADN, este reprezentat de două bucle de tip 'fermoar', plasate la ambele margini ale heteroduplexului, cu rol de menținere constantă a mărimii hibridului în cursul mișcărilor laterale ale ARN polII (după Cramer și Bushnell, 2001).

În ceea ce privesc interacțiile ADN-proteine, s-a determinat că matrița ADN minimă suficientă menținerii stabilității funcționale a complexului TEC conține următoarele elemente: 9 pb cuprinse între poziția +3 și +11 din duplexul ADN, 2 nucleotide din poziția +1 și +2 ale matriței ADN neîmperecheate și 6 nucleotide cuprinse între pozițiile –1 și –6 , ce vor participa la formarea hibridului ARN-ADN.

În ceea ce privește bucla de transcriere, acesta este stabilizată de așa-numita bucla-R formată de cele 9pb ale heteroduplexului, respectiv de bucla RZ, ce menține marginea proximală a heteroduplexului.

43. MECANISMUL DE DEPLASARE A ARN *(RNA DISPLACEMENT)*

Până în prezent s-au emis două teorii cu privire la deplasarea ARN în cadrul complexului TEC. În prima teorie, închiderea duplexului ADN plasat proximal ('*upstream*') induce sau facilitează deplasarea ARN în cursul elongării. În cea de-a două teorie, deplasarea ARN ar reprezenta una din funcțiile active ale ARN polII.

44. TERMINALIZAREA TRANSCRIERII

Semnalul intrinsec de terminalizare prezent în ADN conține un element bogat în GC urmat de o secvență oligo(T). ARN-ul nascent formează un *hairpin* stabil urmat de 7-9 resturi de uracil (U). Formarea unei structuri de tip *hairpin* este esențială pentru terminalizarea transcrierii (Fig.61.).

Maniera de terminalizare a transcrierii este încă discutabilă. Una din teorii pune terminalizarea pe seama extragerii de către *hairpin* a ARN-ului din situsul de legare a ARN. Într-o altă teorie, terminalizarea este indusă de colapsul buclei de transcriere, colaps apărut prin scurtarea hibridului ADN-ARN ca urmare a formării *hairpin*-ului. Conform noilor date cu privire la funcționarea complexului TEC, se pare că terminalizarea se realizează prin ambele mecanisme. Într-adevar, contactele regiunii transcriptului care participa la formarea buclei **stem** a *hairpin*-ului (înaintea poziției –7) sunt cruciale pentru integritatea complexului TEC. Invazia buclei stem ARN în regiunea proximală a hibridului ARN-ADN poate întrerupe aceste contacte, determinând colapsul buclei de transcriere de la nivelul marginii proximale. Acest lucru se realizează fie prin 'topirea' parțială a hibridului ARN-ADN, fie prin translocarea timpurie a ARN polII.

Apropierea ARN polII de capatul 3' al unei gene declanșează o serie de evenimente reprezentate, pe lângă terminalizare sau eliberarea polimerazei

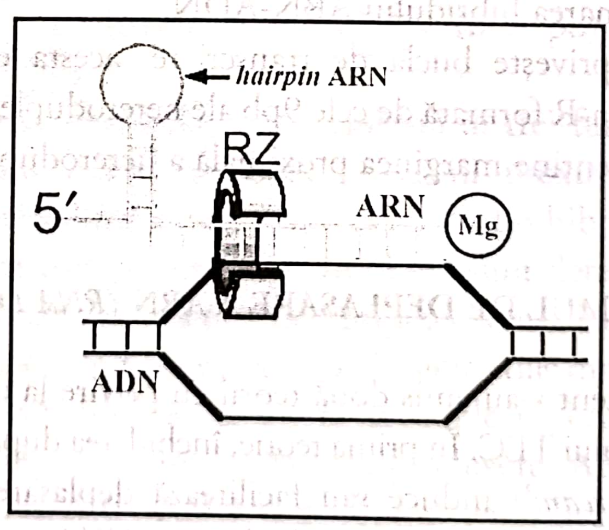


Fig. 61 — Terminalizarea transcrierii (dupa Korzheva si Mustaev, 2001).

de pe matrița ADN, de procesarea transcriptului primar și *splicing*-ul intronilor.

45. PROCESAREA ARNm PREMATUR

ARN mesager matur eucariot ia naștere din precursori mult mai mari ce reprezintă produșii primari ai ARN polII, rezultați printr-o serie de etape de procesare ce presupun: (1) bonetarea capatului 5' și (2) poliadenilarea capatului 3' .

45.1. BONETAREA *(CAPPING)* CAPĂTULUI 5' AL ARN PREMATUR

Când ARN primar are o lungime de doar 25 baze azotate, acesta este modificat prin adiția unui '***cap***' de tipul 7 metilguanozin trifosfat 5' (7meGTP5'). La scurt timp după aceasta, într-o altă reacție co-transcripțională, la ***cap*** se leagă complexul CBC (CBC- C*ap* B*inding* C*omplex*) care stimulează ulterior procesul de *splicing* și procesarea capătului 3'. Bonetarea capătului 5' este realizată de 3 enzime: trifosfataza Cet1, ce îndepărtează

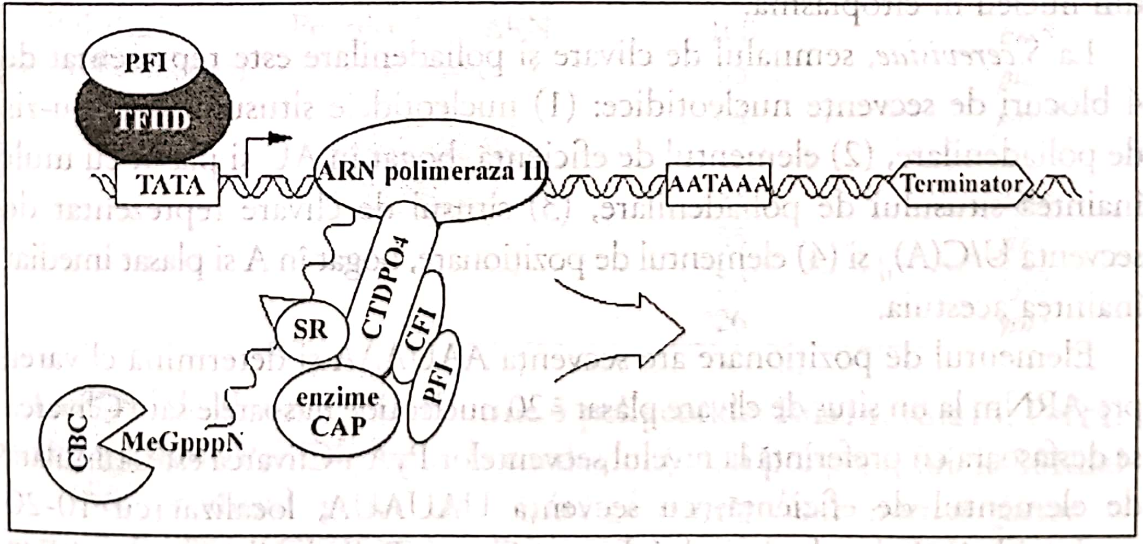


Fig. 62 — Cuplarea transcrierii de către ARN polII cu procesarea ARN pre-mesager la drojdii (după Bentley, 1999).

o grupare fosfat, guanilil-transferaza Ceg1, ce adaugă GMP, și o 7-metil-transferaza (metilaza) ce modifică G terminală.

Când ARN polII inițiază lanțul ARN, domeniul CTD al enzimei este hipofosforilat și devine hiperfosforilat atunci când transcriptul măsoară 25 baze lungime. În această stare de hiperfosforilare, la domeniul CTD se leagă guanilil-transferază. Metilaza se leagă, de asemenea, direct la domeniul CTD într-o manieră dependentă de fosforilarea acestuia, astfel că cele trei enzime de bonetare acționează concertat (Fig. 62.).

45.2. POLIADENILAREA CAPĂTULUI 3' AL ARNm PREMATUR

Cu excepția ARNm ce codifică histonele de la metazoare, toți transcripții ARN polII de la eucariote pierd o serie de secvențe nucleotidice de la nivelul capătului 3' al transcriptului primar prin clivaj endonucleolitic, urmat de dobândirea unei cozi poliadenilate (poli(A)) plasată în fața produsului de clivare.

Coada poli(A) de la capatul 3' al ARNm funcționează în inițierea translației: interacția mediată de proteină cu ***cap***-ul de la capătul 5' al ARN încarcă subunitatea ribozomala 40S pe ARNm. În plus, cozile poli(A) joacă rol și în reglarea stabilității ARNm, fiind implicate și în exportul ARNm din nucleu în citoplasmă.

La *S.cerevisiae*, semnalul de clivare și poliadenilare este reprezentat de 4 blocuri de secvențe nucleotidice: (1) nucleotidele situsului propriu-zis de poliadenilare, (2) elementul de eficiență, bogat în AU și plasat cu mult înaintea situsului de poliadenilare, (3) situsul de clivare reprezentat de secvența $U/C(A)_n$ și (4) elementul de poziționare, bogat în A și plasat imediat înaintea acestuia.

Elementul de poziționare are secvența AAUAAA și determină clivarea pre-ARNm la un situs de clivare plasat ~20 nucleotide în spatele său. Clivarea se desfășoară cu preferință la nivelul secvențelor PyA_n. Clivarea este stimulată de elementul de eficiență, cu secvența UAUAUA, localizat cu 10-20 nucleotide înaintea elementului de poziționare. Poliadenilarea este inițiată la nivelul situsului propriu-zis de poliadenilare și are ca rezultat apariția unei cozi poli(A) care, la drojii, are o lungime de 50-70 nucleotide.

Ca și bonetarea, clivarea la nivelul situsului poli(A) este dependentă de domeniul CTD al subunității RPB1 a ARN polII. Domeniul CTD mediază legarea factorului PF1 (PF1- *Polyadenilation Factor 1*) la ARN polII și stimulează reacția de clivare prin legarea la nivelul său a factorului CF1(CF-*Cleavage Factor 1).*

Clivajul specific necesită o serie de factori CF de clivare: CFIA, CFIB și CFII. Poliadenilarea specifică a ARN pre-clivat necesită factorii CFIA și CFIB, factorul de poliadenilare PF1 și poli(A) polimeraza (Tabel 6. și Fig. 63.).

Tabel 6. Factorii de procesare a capătului 3' al ARN prematur la drojdii (după Keller și Sebastia, 1997).

Factor de procesare	Reacția	Compoziția polipeptidică (Kdal)	Gena
		76	*rna14*
CF1A	Clivare și poliadenilare	72	*pcf11*
		50	*clp1*
		38	*rna15*
	Poliadenilare	70	*pab1*
CF1B	Clivare	73	*hrp1*
CFII	Clivare	150	*cft1*
		105	*cft2*
		150	*ctf1*
		105	*ydh1*
PFI/Pap1	Poliadenilarea ARN	100	*brr5*
(poli(A) polimeraza)	pre-clivat	85	*pta1*
		64	*pap1*
		58	*pfs1*
		55	*fip1*
		53	*pfs2*
		26	*yth1*

Factorul de clivare CFIA conține 5 polipeptide: Rna14, Rna15, Pcf11, proteina majoră Pab1 de legare la coada poli(A), și polipeptidul de 50Kdal care este produsul genei *clp1* (*clp1-cleavaje/poliadenilation factor1*). Factorul de clivare CFIB constă dintr-o singură polipeptida (Hrp1) și este necesar ambelor reacții de procesare a capătului 3', funcționând ca reglator al selecției situsului de clivare în cursul formării capătului 3' al ARNm.

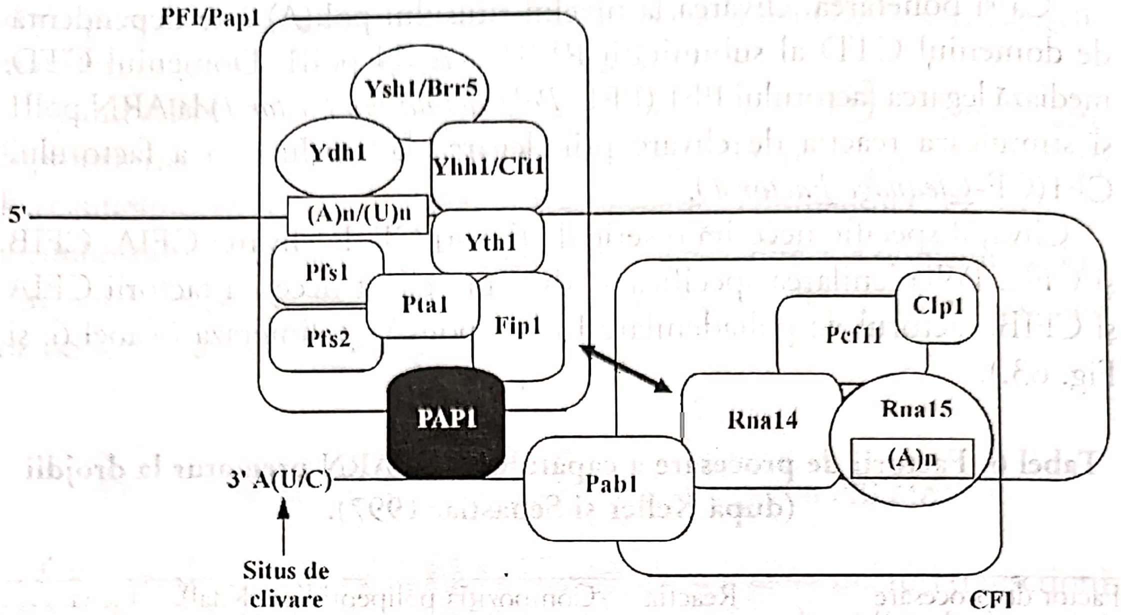


Fig. 63 — Complexul de poliadenilare a capătului 3' al ARN prematur la *S.cerevisiae* (după Keller și Sebastia, 1997).

Poli(A) polimeraza este prima componentă a sistemului de procesare ce a fost purificată. Polipeptida de 64Kdal conține 5 subunități, dintre care doar 4 au omologi la om. Pap1 este necesară doar în cursul poliadenilării, la sinteza cozilor poli(A) cu lungime specifică.

46. *SPLICING*-UL ARN PREMATUR

Multe din genele eucariote sunt mult mai lungi decât ARNm corespunzător. Prezența secvențelor adiționale explică discrepanța de mărime între ARN-ul nuclear și ARN-ul mesager. Nucleul conține transcripții primari ce corespund secvenței genei. Îndepărtarea secvențelor adiționale din transcriptul primar se realizează înainte ca moleculele de ARN să fie transportate în citoplasmă ca ARNm.

Pentru a descrie relația dintre o genă și produsul său ARN s-a definit termenul de 'genă întreruptă', alcătuită dintr-o alternanță de exoni și introni. Exonii sunt secvențele reprezentate în ARN-ul matur. Prin definiție, o genă începe și se termină cu exoni, corespunzând capetelor 5' și 3' ale ARN. Intronii sunt secvențe adiționale, interpuse și îndepărtate atunci când transcriptul primar (pre-ARNm) este procesat la ARN matur în cadrul procesului de ***splicing* a ARN**. Acest proces presupune îndepărtarea precisă a intronilor, cu unirea capetelor moleculei ARN și formarea unei molecule intacte covalente.

Gene întrerupte sunt prezente la toate clasele de microorganisme, abilitatea de a reconstitui secvențele codificatoare intacte fiind o necesitate comună. La eucariotele inferioare, genele întrerupte reprezintă un procent minor din totalul genelor. De exemplu, la *S.cerevisiae*, majoritatea genelor (>96%) sunt gene continue. La *S.cerevisiae*, teoretic, nu există gene întrerupte cu mai mult de 4 exoni. Ca o consecință a acestui tip de organizare, genele de la drojdii au o lungime de 1.4 kb, doar câteva fiind mai mari de 5 kb. În contrast, la *Drosophila sp.* și la mamifere, doar câteva gene sunt mai mici de 2kb, multe având lungimi cuprinse între 5 kb și 100kb.

Splicing-ul ARN, impreună cu toate celelalte modificări (bonetare la capatul 5’ și poliadenilare la capatul 3’) ale ARN-ului nou sintetizat, se desfășoară în nucleu.

Splicing-ul nuclear al intronilor are loc la nivelul situsurilor de îmbinare (‘*splice sites*’) – cele două granițe exon-intron ce includ situsurile de rupere și reunire. Aceste situsuri sunt desemnate drept ‘situs de îmbinare 5”, plasat la capătul 5’ al intronului, și ‘situs de îmbinare 3” plasat la capătul 3’ al aceluiași intron. Mecanismul de *splicing* ARN debutează cu o incizie la nivelul situsului de îmbinare 5’, separând exonul stâng și molecula intron-exon dreaptă (Fig. 64.)

Exonul stâng ia forma unei molecule lineare, iar molecula intron-exon dreaptă formează o structură de tip ‘funie’, în care capătul 5’ generat la sfârșitul intronului se leagă printr-o legătură de tip 5’-2’ la una din bazele azotate ale intronului. Baza azotată țintă este o A dintr-o secvență denumită ‘situs ramură’ (‘*branch site*’).

În etapa următoare, incizia situsului de îmbinare 3’ eliberează intronul din forma ‘funie’, în vreme ce exonul drept este ligat (lipit) la exonul stâng. Forma ‘funie’ este ulterior deramificată dând naștere unui intron linear rapid degradat.

Secvențele necesare *splicing*-ului sunt secvențe *consensus* scurte de la nivelul situsurilor de îmbinare 5’ și 3’ ale intronului și de la nivelul situsului ramură. La drojdii, situsul ramură este înalt conservat și conține secvența *consensus*

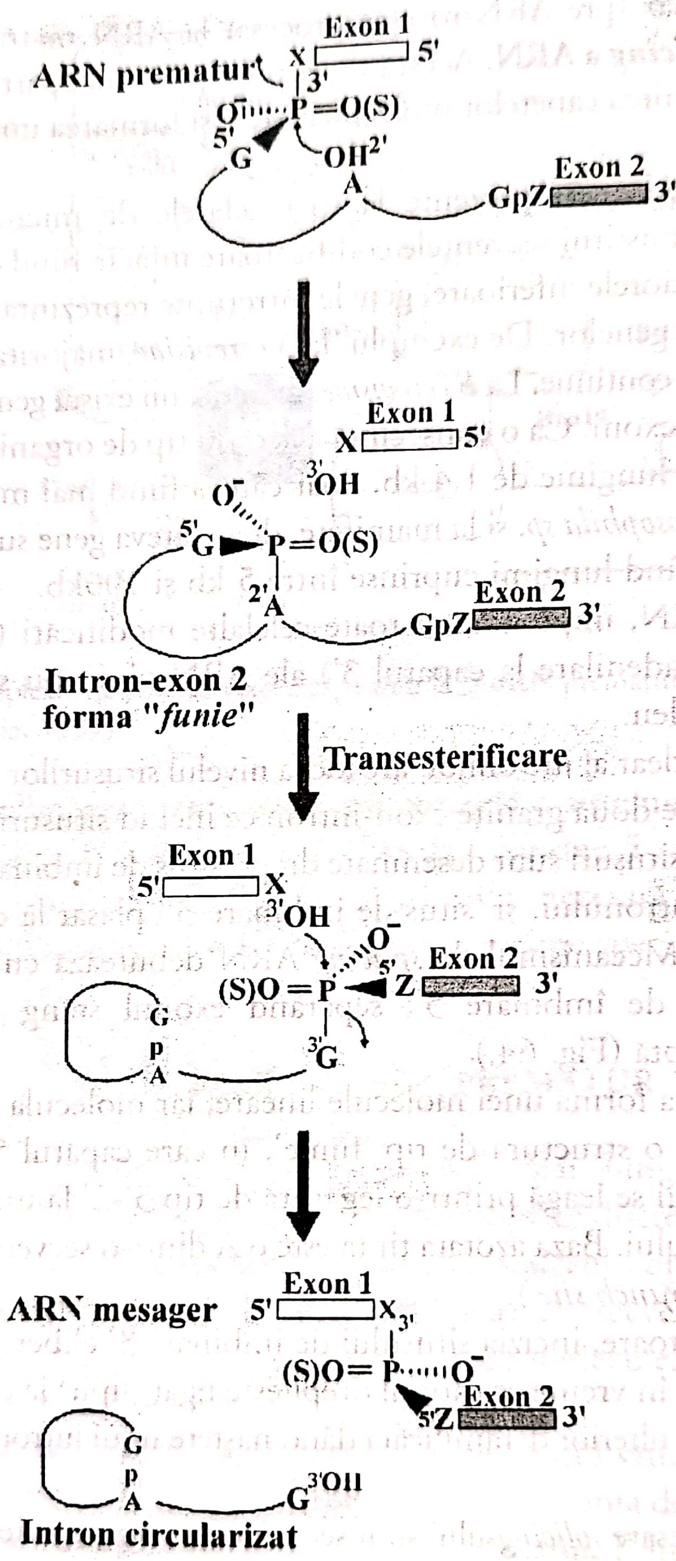

Exon 1
ARN prematur
X
5'
3'
O⁻
P=O(S)
5'
G
OH 2'
A
GpZ
Exon 2
3'
Exon 1
X
5'
3' OH
O⁻
5' G
P=O(S)
2' A
GpZ
Exon 2
3'
Intron-exon 2
forma "*funie*"
Transesterificare
Exon 1
5'
X
3' OH
O⁻
(S)O=P
5' Z
Exon 2
3'
G
p
A
3' G
ARN mesager
Exon 1
5'
X 3'
(S)O= P
O⁻
5' Z
Exon 2
3'
G
p
A
G 3'OH
Intron circularizat

Fig. 64 — Etaple *splicing*-ului ARN prematur (după Will si Luhrmann, 1997).

UACUAAC. Acest situs este plasat cu ~18-40 nucleotide înaintea situsului 3' și rolul său este de a identifica cel mai apropiat situs 3' ca țintă pentru conectarea la situsul 5'.

Legătura 5'-2' ce formează forma 'funie' provine de la poziția 5' a G prezente la capatul 5' al intronului și poziția 2' a A din situsul ramură. La drojdii, aceasta corespunde celui de-al treilea rest de A din secvența UACUAAC.

Reacțiile chimice au loc prin transesterificare – legătura este transferată de o locație la alta. Prima etapă constă în atacul nucleofilic a capătului 2'OH al restului de A din secvența *consensus* UACUAAC la situsul 5'. În a doua etapă, capatul 3'OH liber al exonului eliberat de prima reacție atacă legătura de la nivelul situsului 3'.

Situsurile de îmbinare 3' și 5' ca și situsul ramură sunt recunoscute de componentele aparatului de *splicing* ce se asamblează dând naștere unui complex larg. Acest complex se asamblează secvențial, *splicing*ul având loc numai după asamblarea tuturor componentelor.

Aparatul de *splicing* conține atât proteine cât și molecule ARN. Moleculele ARN iau forma unor molecule mici ce există ca particule ribonucleoproteinice. Atât nucleul, cât și citoplasma celulelor eucariote, conțin câteva specii ARN mic (*small RNA*). La drojdii, acestea au o lungime de ~1kb, spre deosebire de eucariotele superioare, unde măsoară 100-300 b.

Moleculele ARN a căror prezență este limitată la nivelul nucleului sunt denumite molecule ARN nucleare mici (*snRNA- small nuclear RNA*), iar cele prezente în citoplasmă sunt definite ca molecule ARN citoplasmatice mici (*scRNA- small cytoplasmic RNA*). În stare naturală, acestea există ca particule ribonucleoproteinice nucleare și respectiv citoplasmatice (snRNP și scRNP).

SnRNP implicate în procesul de *splicing*, împreună cu unele proteine, formează un complex mare denumit **spliceosom**. Spliceosomii au rol în recunoașterea situsurilor corecte de tăiere de la nivelul precursorilor ARNm nucleari și catalizează îndepărtarea cu acuratețe a intronilor. Spliceosomul se formează pe un precursor ARN intact și trece printr-o formă intermediară în care conține molecula lineară a exonului 5' și forma 'funie' alcătuită din intron-exon. Prezența produșilor de *splicing* la nivelul spliceosomului sugerează că incizia situsului 3' și ligarea exonilor sunt imediat urmate de eliberarea produsului.

SnRNP implicate în *splicing* sunt U1, U2, U5 și U4/U6, corespunzător moleculelor snRNA prezente. SnRNP U1, U2 și U5 conțin fiecare un singur snRNA și câteva proteine (<20), snRNP U4/U6 conține ambele molecule snRNA U4 și U6 și câteva proteine.

Corelat cu funcțiile snRNP-lor, *splicing*-ul, respectiv asamblarea spliceosomului, este împărțit în mai multe etape. În prima etapă se formează complexul E (*Early presplicing*) ce conține snRNP U1, factorii de *splicing* U2AF (*U2 Auxiliary Factor*) și alte câteva proteine. Complexul E este denumit și complex de angajare, deoarece identifică un pre-ARNm ca substrat pentru formarea spliceosomului. La nivelul său, siturile de îmbinare 3' și 5' sunt recunoscute inițial de către snRNPU1 și de factorii U2AF. Formarea complexului E debutează cu legarea snRNA U1 prin împerechere de baze la situsul 5' al intronului (Fig. 65.).

Factorii de *splicing* U2AF se leagă la o regiune de poli-Py plasată după situsul ramură. SnRNP U1 și U2AF sunt necesare legării snRNP U2 la situsul ramură, pe baza secvențelor de complementaritate dintre snRNA U2 și situsul ramură. O secvență din vecinătatea capătului 5' al snRNA se împerechează cu secvența ramură din intron. La drojdii, în mod obișnuit se formează un duplex de 7 pb ce conține întreaga cutie UACUUAAC. Legarea snRNP U2 la situsul ramură din complexul E generează complexul A de pre-*splicing*. Complexul A conține proteine SR, ce conțin 1-2 domenii de legare la ARN, bogate în serină și arginină (SR-*Serine-arginine rich*), cu rol de factori de *splicing*, și reglatori. Acestea au o specificitate scăzută de legare la ARN, dar sunt componente esențiale ale spliceosomului, formând o rețea pe substratul ARN. Ele conectează U2AF cu U1 (Fig. 66.).

Complexul B1 se formează prin legarea trimerului snRNP U5 și U4/U6 la complexul A. Acest complex este privit ca un spliceosom, deoarece conține componentele necesare reacției de *splicing*. Complexul B1 este convertit la complexul B2 prin eliberarea snRNP U1. Reacția catalitică este declanșată prin eliberarea ATP-dependentă a lui U4, al cărui rol este de a sechestra snRNA U6. În snRNP U4/U6, pe o lungime de 26 de baze, U6 este împerecheat cu două regiuni separate ale U4 (Fig. 67.). Prin disocierea lui

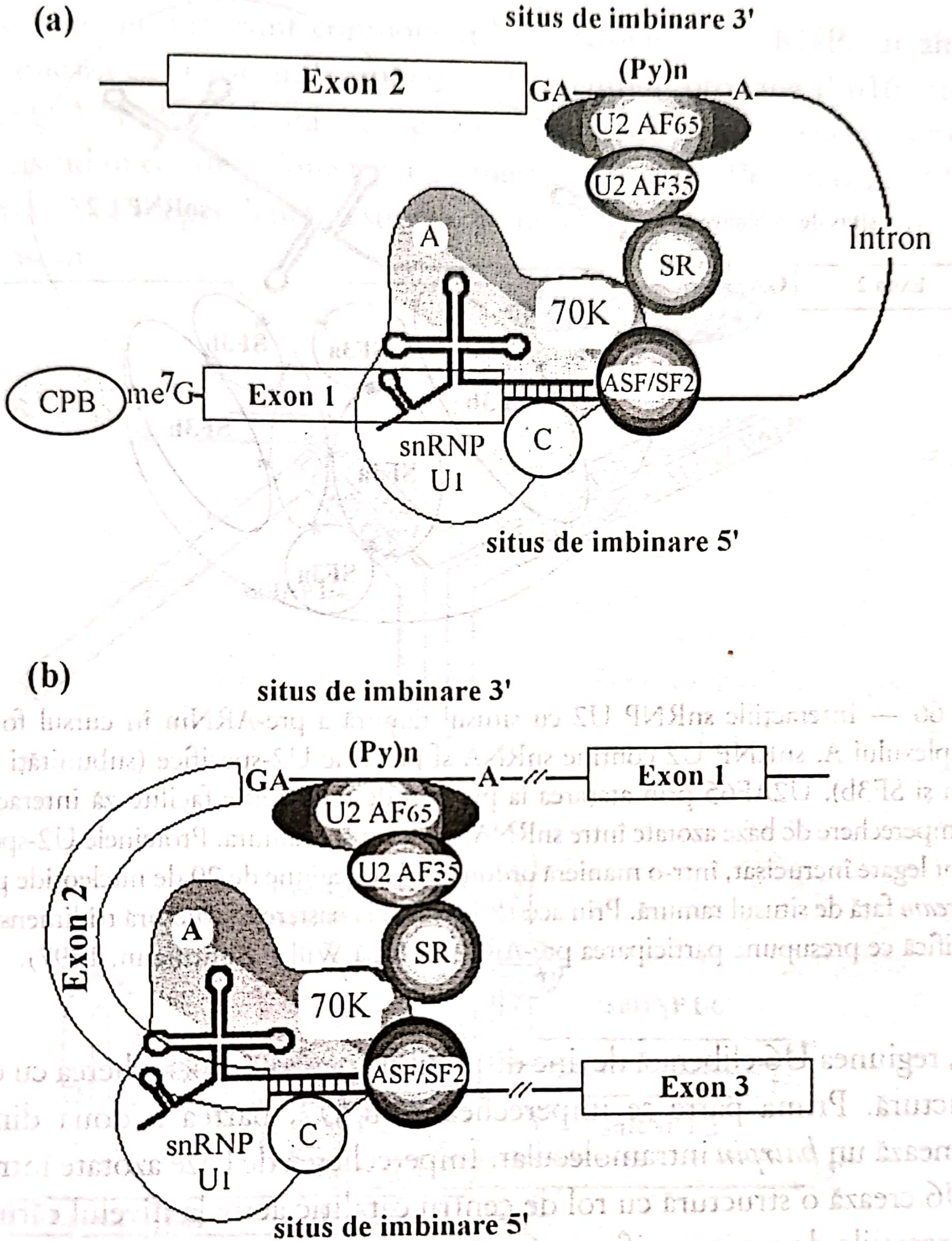

(a)
situs de imbinare 3'
Exon 2
GA
(Py)n
A
U2 AF65
U2 AF35
A
SR
Intron
70K
CPB
me7G
Exon 1
ASF/SF2
C
snRNP
U1
situs de imbinare 5'
(b)
situs de imbinare 3'
(Py)n
GA
A
Exon 1
U2 AF65
U2 AF35
Exon 2
A
SR
70K
ASF/SF2
Exon 3
C
snRNP
U1
situs de imbinare 5'

Fig. 65— Interacțiile proteine-proteine si proteine-ARN ce au loc în cursul formării complexului E. Interacțiile dintre factorii legați la situsurile de îmbinare 5' si 3' pot avea loc la nivelul unui intron (a) sau a unui exon (b). snRNP U1 constă din snRNA U1 și proteine U1-specifice (70k, A și C). Recrutarea snRNP U1 la situsul de îmbinare 5' de către ASF/SF2 implică o interacție între ASF/SF2 și U1-70K. Proteinele SR leagă situsurile de îmbinare 3' si 5' prin interacția lor simultană cu U1-70K și U2AF35. U2AF65 contactează (Py)n și U2AF35. Legarea CBP promovează interacția dintre U1 și situsul de îmbinare 5' (după Will si Luhrmann, 1997).

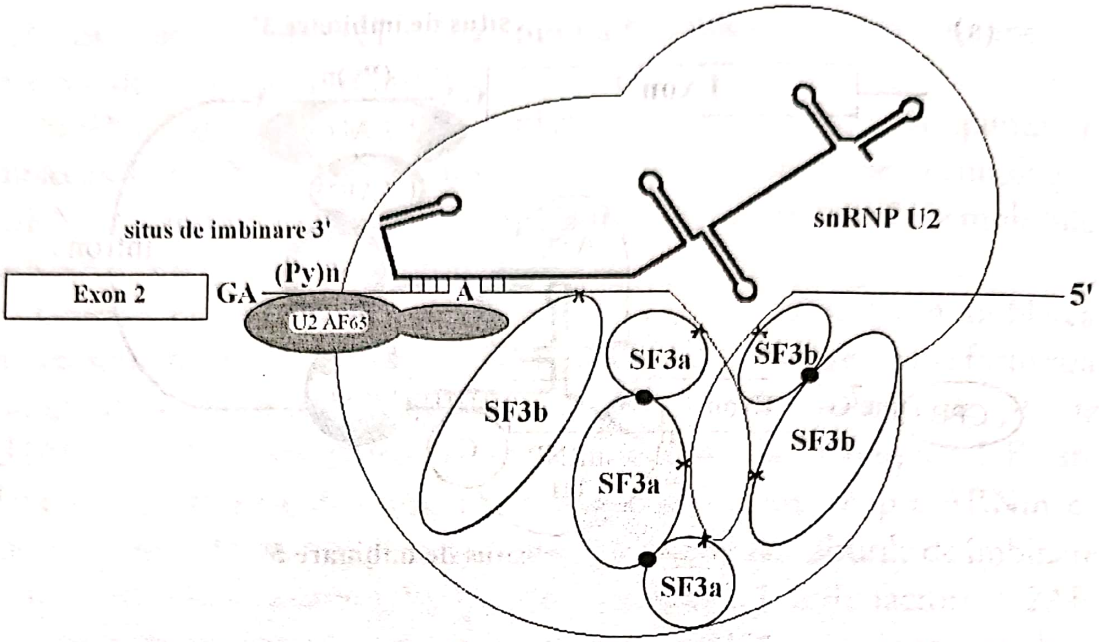


Fig. 66 — Interacțiile snRNP U2 cu situsul ramură a pre-ARNm în cursul formării complexului A. snRNP U2 conține snRNA și proteine U2-specifice (subunități de tip SF3a și SF3b). U2AF65 prin atașarea la punctul de ramificație facilitează interacția de tip împerechere de baze azotate între snRNA U2 și situsul ramură. Proteinele U2-specifice se pot legate încrucișat, într-o manieră ordonată, la o regiune de 20 de nucleotide plasată *upstream* față de situsul ramură. Prin aceste interacții ia naștere o structură tridimensională specifică ce presupune participarea pre-ARNm (după Will si Luhrmann, 1997).

U4, regiunea U6 eliberată devine disponibilă pentru împerecherea cu o altă structură. Prima parte se împerechează cu U2, partea a două din U6 formează un *hairpin* intramolecular. Împerecherea de baze azotate între U2 și U6 crează o structură cu rol de centru catalitic activ la nivelul căruia au loc reacțiile de transesterificare.

Apariția formei 'funie' la nivelul situsului de ramificare este responsabilă de folosirea situsului 3' al intronului, deoarece secvența *consensus* 3' din vecinatatea regiunii 3' a ramurii devine ținta pentru cea de-a doua transesterificare, ce presupune legarea snRNP U5 la situsul 3' al intronului (Fig. 68.).

La drojdii, s-au identificat o serie de proteine implicate în cele două reacții catalitice, proteine colectiv denumite proteine Prp (*pre-RNA processing*).

Unele proteine Prp sunt componente ale particulelor snRNP, iar altele funcționează ca factori independenți. De exemplu, proteina Prp16 este o helicază ATP-dependentă ce se asociază tranzient cu spliceosomul, participând în cea de-a doua reacție catalitică. Proteina Prp22, o altă ARN helicază ATP-dependentă, este necesară eliberării ARNm matur din spliceosom.

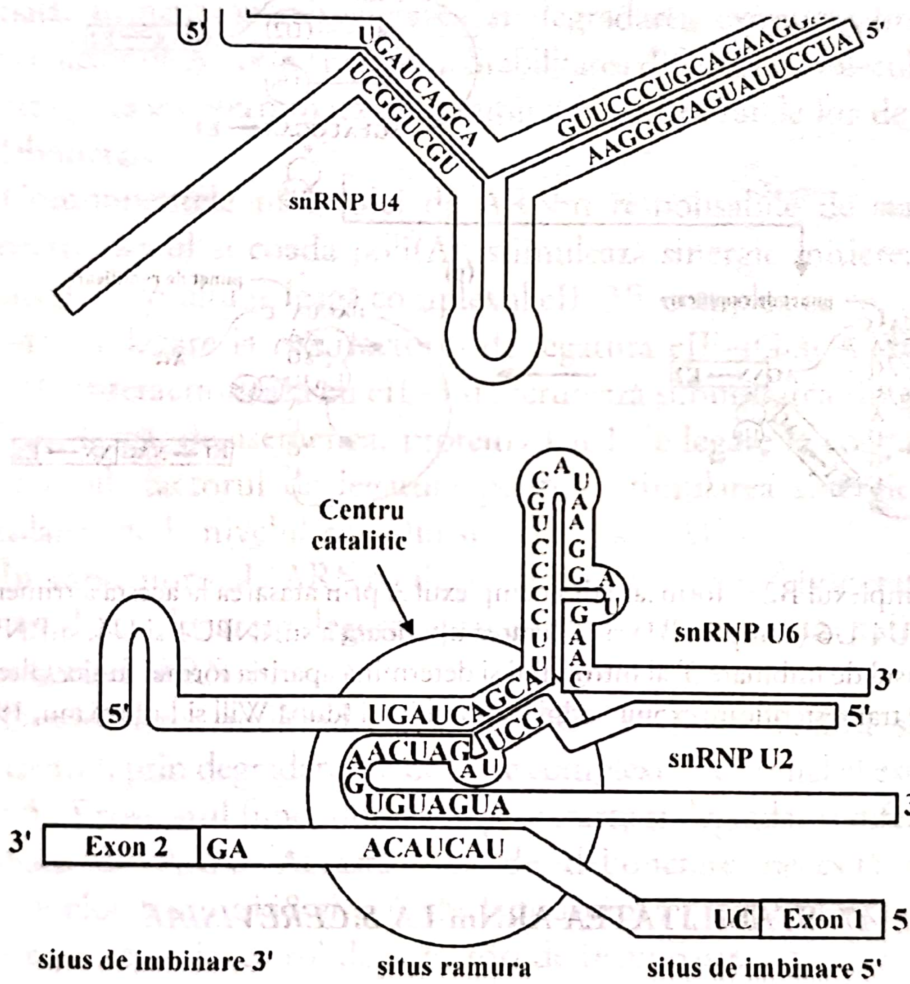

5'
UGAUCAGCA
UCGGUCGU
GUUCCCUGCAGAAGG
AAGGGCAGUAUUCCUA
5'
snRNP U4
Centru catalitic
CAUAAGGAU
GUCCCCCUU
GAAC
snRNP U6
3'
5'
UGAUCAGCA
UCG
5'
AACUAGAU
G
snRNP U2
UGUAGUA
3'
3'
Exon 2
GA
ACAUCAU
UC
Exon 1
5'
situs de imbinare 3'
situs ramura
situs de imbinare 5'

Fig. 67 — Împerecherea U6-U4 este incompatibilă cu împerecherea U6-U2. Atunci când se atașează spliceosomului, U6 este împerecheat cu U4. Prin îndepărtarea ATP-dependentă a lui U4, U6 se modifică conformațional: o parte din secvența liberă formează un *hairpin*, iar cealaltă parte se împerechează cu U2. Deoarece o regiune adițională a U2 este deja împerecheată cu situsul ramură, acesta leagă U6 prin juxtapunere cu situsul ramură (după Lewin, 1997).

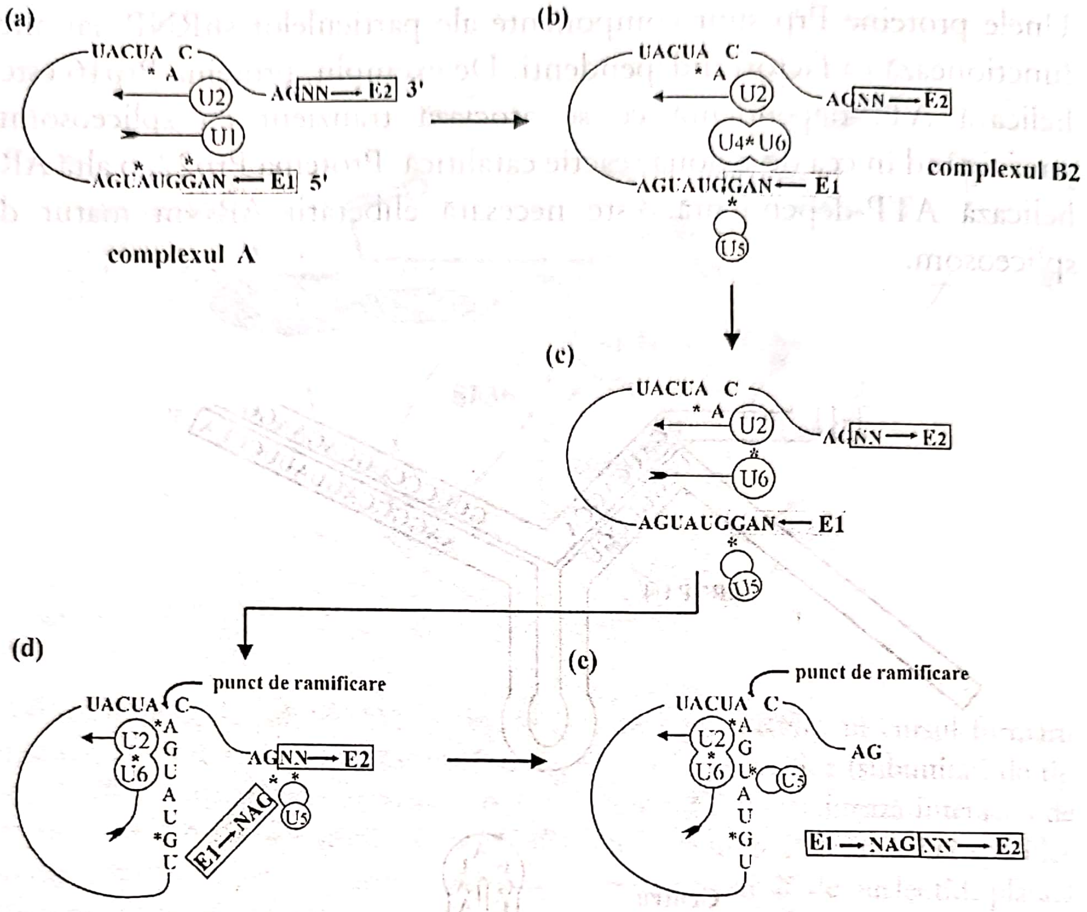

(a)
UACUA C
A
U2
U1
AG NN E2 3'
AGUAUGGAN E1 5'
complexul A
(b)
UACUA C
A
U2
U4 U6
AG NN E2
AGUAUGGAN E1
U5
complexul B2
(c)
UACUA C
A
U2
U6
AG NN E2
AGUAUGGAN E1
U5
(d)
punct de ramificare
UACUA C
U2
U6
A G U A U G U
AG NN E2
E1 NAG
U5
(e)
punct de ramificare
UACUA C
U2
U6
A G U A U G U
AG
U5
E1 NAG NN E2

Fig.68 — Complexul B2 se formează din complexul A prin atașarea la acesta a trimerului snRNPU5 si U4-U6 (complex B1) si eliberarea ulterioară a snRNPU1 si U4. snRNPU5 se leagă la situsul de îmbinare 3' al intronului si determină apariția formei funie. Ulterior, prin reacții de transesterificare exonii vecini sunt îmbinați (după Will si Luhrmann, 1997).

47. STABILITATEA ARNm LA *S.CEREVISIAE*

Deși majoritatea analizelor expresiei genelor eucariote vizează în mod deosebit reglajul transcripțional, stabilitatea ARNm reprezintă un factor important în controlul expresiei genelor. În acest sens, sistemul *S.cerevisiae* este folosit la studiul fenomenului de control a ARNm, a mecanismelor de control calitativ care identifică și degradează moleculele de ARNm aberante.

48. TURNOVER-UL ARNm ȘI TRANSLAȚIA

Turnover-ul ARNm joacă un rol important în reglarea expresiei genice, afectând atât cantitatea totală de proteine ce pot fi sintetizate de la un anumit nivel al transcrierii, cât și momentul continuării translației. În acest context, structura complexului de particule RNP mesagere joacă un rol important în translația și stabilitatea ARNm, existând o corelație strânsă între translația și gradul de degradare al ARNm.

La drojdii, calea majoră de degradare a ARNm implică o deadenilare inițială, urmată de debonetarea și degradarea exonucleolitică 5'→3' a moleculelor de ARNm (Fig. 69.). Stabilitatea diferitelor molecule de ARNm variază și este determinată de combinația dintre ratele lor de deadenilare și debonetare.

Componentele moleculei de ARNm responsabile de stabilitatea sa, respectiv *cap*-ul și coada poli(A), stimulează sinergic inițierea translației. La nivelul *cap*-ului se leagă complexul eIF-3F, complex ce conține proteina eIF-4E de legare la *cap*, factorul de legatură eIF-4G și ATP-aza eIF-4a. eIF-4G interacționează cu eIF-3 și recrutează subunitatea ribozomala 40S. eIF-4G leagă, de asemenea, proteina Pab1 de legare la coada poli(A). În acest mod, factorul de legătură permite stimularea sinergică a inițierii translației de la nivelul *cap*-ului și a cozii poli(A).

În mod normal, ARNm de la drojdii nu este debonetat înainte de deadenilare, deoarece legarea proteinei Pab1 la coada poli(A) previne debonetarea ARNm.

Deadenilarea moleculelor de ARNm se poate realiza și pe o cale alternativă, prin degradarea sa de către complexul exosomal al exonucleazelor 3'→ 5'. **Exosomul** funcționează în procesarea și degradarea diferitelor tipuri celulare de ARN. Această cale de debonetare necesită participarea proteinelor Ski3, Ski8 și a ARN helicazei ATP-dependentă Ski2. Toate aceste proteine joacă rol de cofactori de recunoaștere a substratului.

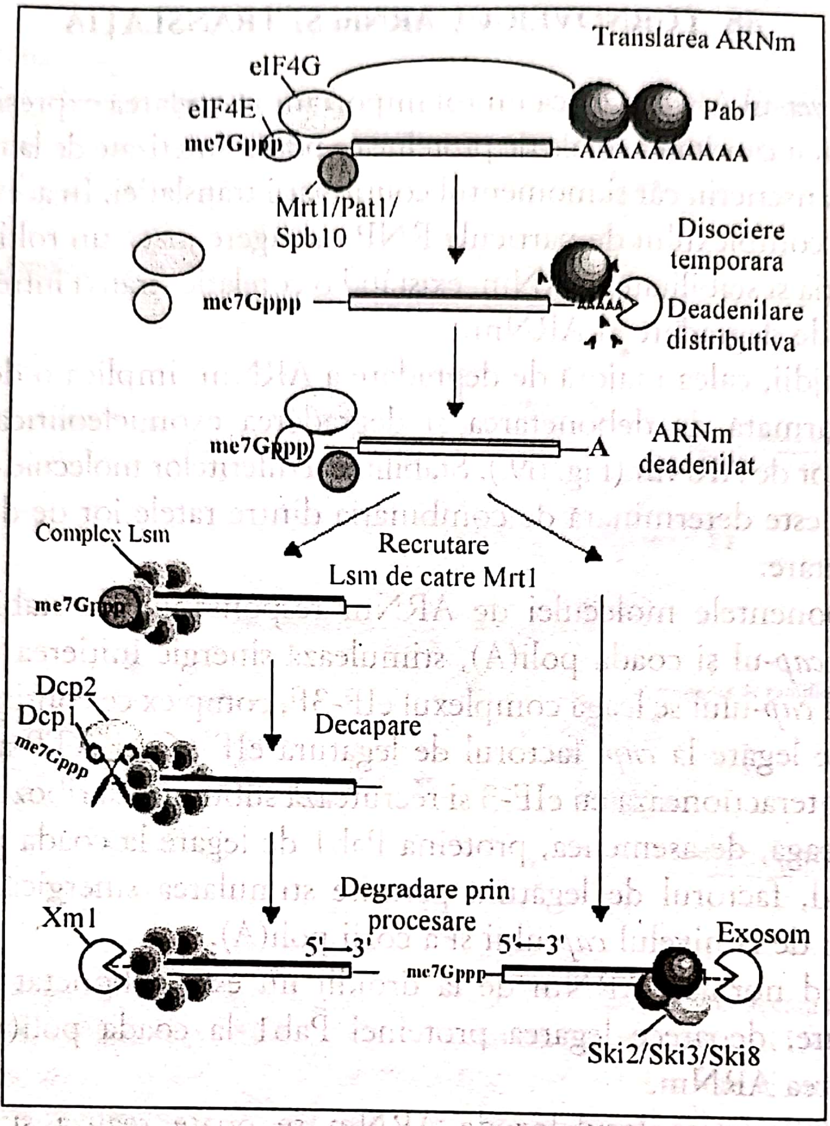

Translarea ARNm
eIF4G
eIF4E
me7Gppp
Pab1
AAAAAAAAAA
Mrt1/Pat1/
Spb10
Disociere
temporara
me7Gppp
Deadenilare
distributiva
me7Gppp
A
ARNm
deadenilat
Complex Lsm
Recrutare
Lsm de catre Mrt1
me7Gppp
Dcp2
Dcp1
me7Gppp
Decapare
Degradare prin
procesare
Xrn1
5'→3'
5'←3'
me7Gppp
Exosom
Ski2/Ski3/Ski8

Fig. 69— *Turnover*-ul ARNm și inițierea translației la drojdii. Inițierea translației este puternic stimulată de interacțiile dintre proteina Pab1 și factorul de inițiere eIF-4G. Întreruperea acestor interacții conduce la scăderea ratei de deadenilare a moleculelor de ARNm. Proteina Pab4 interacționează și cu alți factori de inițiere a translației, precum Mrt1. După deadenilarea a circa 10 resturi de adenina (A_{10}), ARNm este degradat. În calea majoră de degradare, factorul de inițiere Mrt1 recrutează proteina Lsm1 la nivelul ARNm ca parte componentă a complexului Lsm. Aceasta interacționează cu proteinele de decaparare Dcp1 și Dcp2, promovând decaparea și degradarea exonucleotidică 5'→3' prin proteina Xrn1. În calea alternativă, ARNm este degradat 3'→5' de către exosomi. Degradarea cu ajutorul acestui complex necesită participarea unor cofactori de tipul proteinelor Ski2, Ski3 și Ski8. Pentru acești cofactori, ordinea de acțiune și funcția lor în stimularea și/sau recrutarea exosomului sunt încă necunoscute (după Mitchell și Tollervey, 2000).

49. DEADENILAZELE ARNM

În mod surprinzător, deadenilazele ARNm sunt foarte puțin caracterizate, relația dintre deadenilaze și proteina Pab1 fiind încă neclară, deși se știe că Pab 1 stimulează deadenilarea.

În celulele umane, recent s-a identificat nucleaza DAN (*Deadenilating nuclease*), o exonuclează 3’→5’ poli(A) specifică. Exonucleaza DAN interacționează atât cu *cap*-ul 7meG cât și cu coada poli(A), activitatea sa *in vitro* fiind stimulată de legarea la nivelul *cap*-ului. Spre deosebire de celulele umane, la drojdii nu s-au identificat omologi ai exonucleazei DAN. Genomul de drojdii codifică o serie de proteine înrudite cu RNaza D de la *E.coli*. În plus, la drojdii s-a identificat nucleaza PAN (*poli(A) nuclease*), ce posedă o activitate deadenilazică Pab1-dependentă și care funcționează în definirea lungimii cozii poli(A) a ARNm nou sintetizat.

Deadenilarea este urmată de degradarea 3’→5’ ATP-dependentă a ARNm, ce presupune participarea ATP-azei Ski2 în așa-numita ‘cale de degradare 3’→5’’ de la drojdii. Întrucât atât exosomul cât și proteina Ski2 sunt conservate în lumea eucariotă, *turnover*-ul ARNm reflectă calea de degradare 3’→ 5’ stabilită în cazul celulelor de drojdii.

50. MAȘINĂRIA DE DEBONETARE

Debonetarea *in vitro* poate fi efectuată doar de proteina Dcp1 (*Decapping protein 1*). Pe lângă proteina Dcp1 s-a identificat și proteina Dcp2, o nucleozid-difosfatază ce interacționează cu Dcp1 și care este necesară debonetării mediate de Dcp1. Prin debonetare este eliberat *cap*-ul 7meGDP, care este convertit la 7meGMP de către Dcp2.

Debonetarea necesită și participarea **complexului Lsm**, ce interacționează direct cu proteinele Dcp1 și Dcp2. Complexul Lsm este alcătuit din proteinele Lsm1 și Lsm 2-8. Proteinele Lsm2-8 se leagă la capătul 3’ al U6 din structura snRNA, mediind contactul Lsm1 cu U6. La aceasta se adaugă proteina Mrt1, obligatorie pentru debonetarea eficientă și inițierea translației. Proteina Mrt1 se leagă atât la subunitatea ribozomala 40S cât și la nivelul polizomilor, fiind necesară asocierii proteinei Lsm1 cu polizomii. Recrutarea complexului Lsm de către Mrt1 la nivelul polizomilor se realizează prin capatul 5' al ARNm deadenilat. Legarea complexului Lsm promovează accesul proteinelor Dcp la structura *cap* de la capătul 5'.

51. Controlul ARNm

Majoritatea moleculelor de ARNm sunt deadenilate lent înainte de degradarea rapidă. Acest lucru permite un timp de viață pentru translația citoplasmatică, care este aproximativ constant pentru toate speciile de ARN. Timpul de viață al ARNm poate fi drastic redus prin intrarea sa într-o cale specializată de control, ce presupune debonetare înainte de deadenilare. La drojdii, această cale de degradare mediată nonsens (*nonsense-mediated decay*) este alcătuită din proteinele Upf1, Upf2 și Upf3 și acționează la nivelul transcripților ce poartă codoni nonsens prematuri. Căi similare degradează alți transcripți aberanți, inclusiv molecule de pre-ARNm ce nu au fost supuse fenomenului de *splicing*.

Proteina Upf1 este mult mai abundentă decât Upf2 și Upf3 și funcționează direct în terminalizarea translației

La drojii, relația dintre translație și *turnover*-ul ARNm este clară dar, procesul de debonetare a ARNm se dovedește a fi un proces neașteptat de complex.

52. INIȚIEREA TRANSLAȚIEI

Sinteza *de novo* a proteinelor este un proces complex ce implică numeroase etape și componente. Mașinăria de bază este reprezentată de particulele ribozomale cu care factorii de translație, ARNm și aminoacil-ARNt interacționează în cursul sintezei proteinice. Procesul sintezei proteinice implică (1) inițierea, (2) elongarea și (3) terminalizarea lantului peptidic.

Inițierea sintezei proteinice necesită legarea la ribozomi atât a ARNm, cât și a ARNt inițiator al sintezei. În cadrul complexului format de subunitatea ribozomala 80S și ARNm, anticodonul inițiatorului Met-ARNt (metionil-ARN de transfer) interacționează cu codonul start AUG al ARNm. La eucariote, această interacție este mediată de o serie de factori de inițiere eIF (*eukaryotic Initiation Factor*).

Modelul actual de inițiere a sintezei proteice propune asamblarea, într-o primă etapă, a complexului ribozom 80S-ARNm. Factorul eIF-2 formează un complex ternar cu GTP și inițiatorul Met-ARNt. Ulterior, complexul ternar se asociază cu subunitatea ribozomala 40S și cu factorii eIF-1, eIF-1A și eIF-3, formând complexul de preinițiere 48S. O dată asamblat, acest complex este capabil de legarea la ARNm, pregătit pentru legarea la ribozom de către factorul eIF-4 (Fig. 70.).

Ribozomul se leagă la capătul 5' al ARNm, căutând codonul de inițiere AUG în vederea formării complexului de preinițiere 48S. Ulterior, factorul eIF-5 stimulează hidroliza GTP de către factorul eIF-2 în cadrul complexului 48S. Prin această hidroliză, sunt eliberați factorii de inițiere de la nivelul ribozomilor, iar subunitatea ribozomala 60S se atașează la

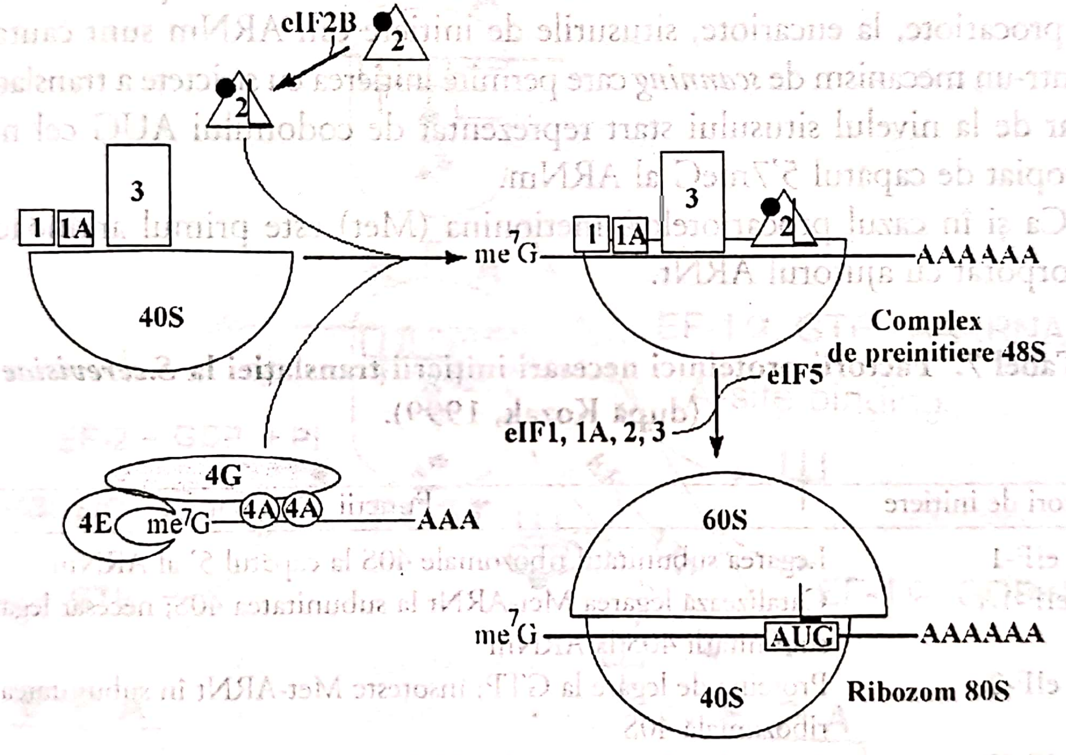


Fig. 70 — Modelul simplificat al inițierii translației. Factorul eIF-2 se leagă la Met-ARNt într-o manieră dependentă de GTP, formând un complex ternar stabil. Acest complex se asociază cu subunitatea ribozomala 40S, împreună cu alți factori de inițiere (eIF-1, eIF-1A și eIF-3). Proteina eIF-4E de legare la *cap*-ul 5'me7G al ARNm, împreună cu factorii eIF-4G și eIF-4A, formează complexul de legare la *cap*(eIF-4). Acest complex se leagă la ARNm și desface structura secundară a ARNm proximal *cap*-ului și, prin interacții cu factori de inițiere asociați subunității ribozomale 40S, facilitează legarea ARNm la ribozom. O dată legată, subunitatea 40S caută pe ARNm codonul de inițiere AUG și formează complexul de preinițiere 48S. Interacția factorului eIF-5 cu complexul 48S stimulează hidroliza GTP de către eIF-2, cu eliberarea factorilor de inițiere și unirea subunității 60S, ce va forma ribozomul 80S capabil de elongarea translației (după Dever, 1999).

subunitatea 40S și încheie procesul de inițiere, cu debutul elongării translației.

Majoritatea moleculelor de ARNm sunt recrutate la ribozomi pe baza recunoașterii *cap*-ului 5' 7meG de către complexul proteinic de legare la *cap*. Acest complex, cunoscut și ca eIF-4, este alcătuit din: ARN helicaza eIF-4A, proteina eIF-4E de legare specifică la 7meG și proteina adaptor eIF-4G, necesară promovării inițierii translației (Tabel 7.).

La procariote, situsurile de inițiere a translației din moleculele policistonice de ARNm sunt selectate, în mod obișnuit, pe baza împerecherilor cu ARN ribozomal, la nivelul codonilor GUG sau UUG. Spre deosebire de procariote, la eucariote, situsurile de inițiere din ARNm sunt căutate printr-un mecanism de *scanning* care permite inițierea cu strictețe a translației doar de la nivelul situsului start reprezentat de codonului AUG cel mai apropiat de capătul 5'7meG al ARNm.

Ca și în cazul procariotelor, metionina (Met) este primul aminoacid incorporat cu ajutorul ARNt.

Tabel 7. Factorii proteinici necesari inițierii translației la *S.cerevisiae* (după Kozak, 1999).

Factori de inițiere	Funcții
eIF-1	Legarea subunității ribozomale 40S la capătul 5' al ARNm
eIF-1A	Catalizează legarea Met-ARNt la subunitatea 40S; necesar legării subunității 40S la ARNm
eIF-2	Proteina de legare la GTP; însoțeste Met-ARNt în subunitatea ribozomală 40S
eIF-2B	Factor de schimb al nucleotidului G; promovează schimbul GDP la GTP mediat de eIF2
eIF-3	Leagă subunitatea 40S; stabilizează Met-ARNt și previne asocierea cu subunitatea 60S
eIF-4E	Legare directă la *cap*-ul 5'me7G
eIF-4G	Facilitează legarea eIF4E la *cap*; necesar inițierii translației
eIF-4A	Helicază și ATP-ază ARN-dependentă, esențială pentru legarea ribozomilor la ARNm
eIF-4B	Proteina de legare la ARN; stimulează legarea ribozomilor la ARNm
eIF-5	Mediază hidroliza GTP asociat cu eIF2 pe subunitatea ribozomală 40S

Elongarea sintezei proteinice

Faza de elongare a sintezei proteinice constă într-un ciclu repetitiv format din trei etape majore, precedate de atașarea Met-ARNt la situsul P al ribozomilor legați la ARNm. (1) În prima etapă, aminoacil-ARNt se leagă la situsul A într-o manieră dependentă de codon, reacție ce necesită factorul eIF-1 și GTP, ce formează un complex ternar cu aminoacil-ARNt. Acest complex se leagă la situsul A ribozomal. (2) După recunoașterea

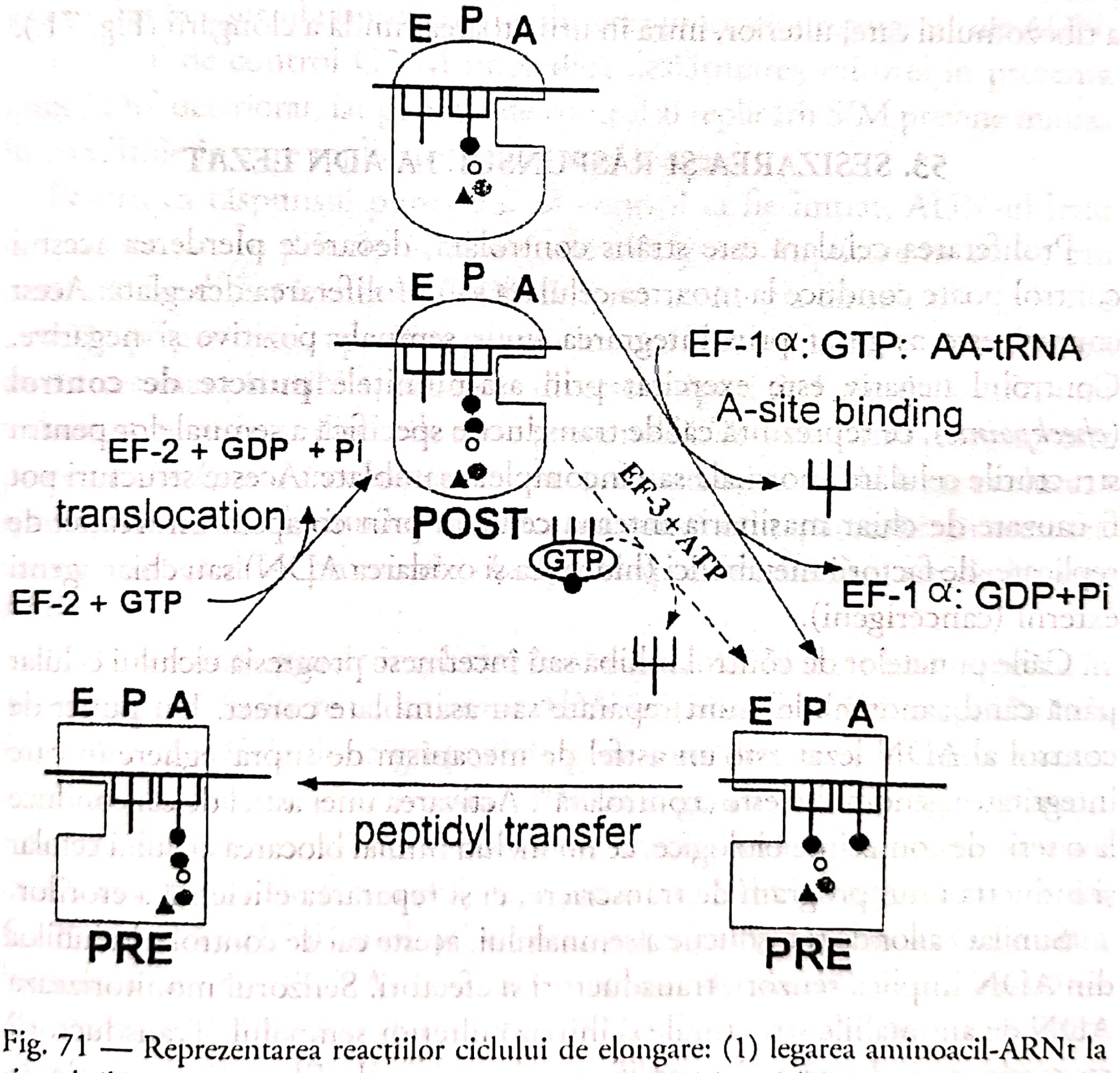

E P A
E P A
EF-1α: GTP: AA-tRNA
A-site binding
EF-2 + GDP + Pi
translocation
POST
GTP
EF-3 × ATP
EF-2 + GTP
EF-1α: GDP+Pi
E P A
E P A
peptidyl transfer
PRE
PRE

Fig. 71 — Reprezentarea reacțiilor ciclului de elongare: (1) legarea aminoacil-ARNt la situsul ribozomal A, (2) formarea legăturii peptidice și (3) translocareaa peptidului. A, P și E indică situsurile ribozomale de legare pentru aminoacil-ARNT, peptidil-ARNt și ARNt deacetilat. PRE și POST indică stările de pretranslație și postranslație al ribozomului (după Chakraburtty, 1999).

codonului, are loc hidroliza GTP și disocierea complexului ternar eIF-1GDP de pe ribozom, capătul 3' al aminoacil-ARNt se acomodează în centrul peptidil-transferazic, cu debutul reacției de transfer peptidic. Formarea legăturii peptidice determină deacetilarea ARNt la situsul P și a peptidil-ARNt din situsul A. (3) Cea de-a treia etapa majoră este reprezentată de translocarea peptidului, mediată de factorul eIF-2 ce hidrolizează GTP în cursul reacției. În cursul translocării, peptidil-ARNt este translocat din situsul A în situsul P, în vreme ce ARNt deacetilat este transferat din situsul P în situsul E, de unde disociază. Astfel, translocarea restabilește starea inițială a ribozomului care, ulterior, intră în următoarea rundă a elongării (Fig. 71.).

53. SESIZAREA ȘI RĂSPUNSUL LA ADN LEZAT

Proliferarea celulară este strâns controlată, deoarece pierderea acestui control poate conduce la moartea celulară sau proliferarea dereglată. Acest control este asigurat prin integrarea unor semnale pozitive și negative. Controlul negativ este exercitat prin așa-numitele **puncte de control** (*checkpoints*), ce reprezintă căi de transducție specifică a semnalelor pentru structurile celulare anormale sau incomplet asamblate. Aceste structuri pot fi cauzate de chiar mașinăria internă celulară prin colapsul bifurcației de replicare, de factorii metabolici (hidroliza și oxidarea ADN) sau chiar agenți externi (cancerigeni).

Căile punctelor de control inhibă sau încetinesc progresia ciclului celular până când „anomaliile" sunt reparate sau asamblate corect. Un punct de control al ADN lezat este un astfel de mecanism de supraveghere în care integritatea genomului este „controlată". Activarea unei astfel de căi conduce la o serie de consecințe biologice, ce nu includ numai blocarea ciclului celular și inducția unui program de transcriere, ci și repararea eficientă a erorilor.

Similar căilor de transducție a semnalului, aceste căi de control a leziunilor din ADN implică senzori, transductori și efectori. Senzorul monitorizează ADN de anomaliile structurale și inițiază ulterior semnalul. Transductorii transmit mai departe și amplifică acest semnal. Efectorii controlează consecințele biologice ale activării căii. Căile de control al ADN deteriorat, ca și căile de transducție a semnalelor, prezintă fenomenul de *down-regulation* a semnalului, adică de adaptare în prezența continuă a semnalului inițiator.

Proteinele *checkpoint* sunt conservate de la drojdii la celulele animale, fapt ce indică că organizarea de bază a acestor căi a fost menținută în cursul evoluției.

Date recente efectuate pe sistemul model *S.cerevisiae* au evidențiat punctele de control ale lezării ADN, în particular maniera de detectare a ADN lezat, transducția semnalului și repararea ADN controlate de aceste căi de control.

Punctele de control reglează toate tranzițiile majore ale ciclului celular mitotic dar și câteva tranziții ale ciclului celular meiotic. Proteinele *checkpoint* joacă rol și în reglajul transcrierii și inducerea proceselor reparatorii ale ADN.

Punctul de control G2/M impiedică desfășurarea mitozei în prezența unui ADN deteriorat, iar punctul de control al replicării S/M previne mitoza în condițiile în care replicarea ADN este blocată.

Pentru ca răspunsul punctului de control să fie inițiat, ADN-ul lezat trebuie sesizat. În principiu, proteinele *checkpoint* implicate în aceste căii recunosc fie direct leziunile ADN, fie prin interacția cu senzori de lezare a ADN preexistenți, specifici pentru leziuni individuale. Această ipoteză este și cea mai plauzibilă, deoarece diversele tipuri de leziuni ale ADN nu trebuie să fie sesizate direct de către proteinele *checkpoint*. Într-adevăr, certe proteine *checkpoint* asociate cu senzori preexistenți ai ADN lezat evoluează spre recunoașterea leziunilor specifice anumitor căi reparatorii. În acest fel, celula implică doar proteinele *checkpoint* specifice fiecărui tip de leziune ADN.

La *S.cerevisiae*, genele implicate în sesizarea ADN lezat funcționează în două grupuri distincte ce sesizează ADN inițial în faza **G1** și apoi în faza **G2** (Fig. 72.). Cele două grupuri de gene sunt definite prin gena *rad9* și subclasa de gene *rad24*, aceasta incluzând genele *rad17, mec3* și *ddc1*. Proteina Rad24 și omologii săi de la alte specii prezintă omologie cu toate cele 5 subunități ale factorului de replicare C (RFC – *Replication Factor C*). Proteina Rad17 și omologii săi prezintă omologie de secvență pe toată lungimea sa cu PCNA (antigen nuclear de proliferare celulară – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*). PCNA și RFC funcționează în replicare ca 'rampă de alunecare' („*sliding clamp*') și respectiv 'încărcător al rampei de alunecare' („*sliding clamp loader*'), permitând sinteza progresivă a ADN de către ADNpol δ. Se pare că Rad24 funcționează ca un factor de încărcare de tip RFC (RFC-*like*) ce permite proteinelor *checkpoint* adiționale de tip

PCNA-*like* să se ,încarce' pe o structură ADN necunoscută. Dată fiind conservarea acestor proteine *checkpoint*, acest model de funcționare poate fi aplicat eucariotelor superioare. De exemplu, în celulele umane, proteinele hRad1, hRad9 și hHus1 prezintă omologie limitată cu PCNA.

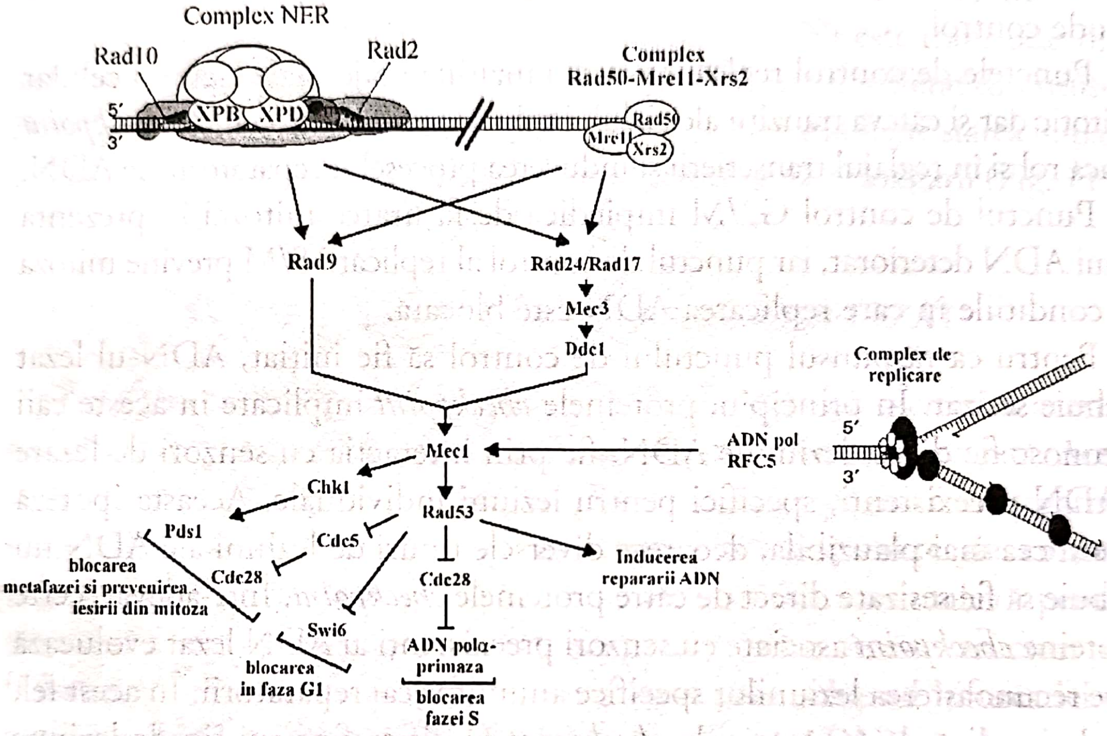

Complex NER
Rad10
Rad2
5′
3′
XPB
XPD
Complex Rad50-Mre11-Xrs2
Rad50
Mre11
Xrs2
Rad9
Rad24/Rad17
Mec3
Ddc1
Complex de replicare
5′
3′
ADN pol
RFC5
Mec1
Chk1
Rad53
Pds1
Cdc5
Cdc28
blocarea metafazei si prevenirea iesirii din mitoza
Cdc28
Inducerea repararii ADN
Swi6
ADN polα-primaza
blocarea in faza G1
blocarea fazei S

Fig. 72 — Organizarea căilor *checkpoint* dependente de ADN lezat la S.cerevisiae. Schematic sunt reprezentate două tipuri distincte de leziuni ale ADN. De asemenea, sunt indicate și unele componente ale complexului NER, specific pentru fotoprodușii UV. Săgețile indică inciziile generate de endonucleazele cu specificitate de structură ERCC1/XPF și XPG. Complexul MRX este implicat în repararea DSB (prin legarea la ADNd.c. – Double Strand Binding). Rad9 și Rad24 definesc brațele anterioare ,sensor' ale căii și se pare că răspund, în primul rând, la ieșirea din faza S, la tipurile multiple de leziuni ADN. Rad9 și Rad24 converg către kinaza Mec1. În timpul fazei S, există una sau mai multe căi independente pentru sesizarea leziunilor ADN, toate aceste căi de sesizare specifice fazei S converg către Mec1. Proteinele Mec1, Rad53 și Chk1 sunt transductori ai semnalului *checkpoint*. Acești transudctori reglează efectorii ce controlează consecințele biologice ale activării acestei căi (blocarea în faza G1/ S, blocarea Metafazei și prevenirea ieșirii din mitoză). Efectorii pentru Rad53 sunt: Dun1, implicat în blocarea G2/M și inducerea Ddr, Swi6, factor transcripțional țintit de punctul de control G1, ADN polα-primaza, una din țintele punctului de control al fazei S, și kinaza Cdc5 care inhibă kinaza Cdc28. Chk1 reglează în principal proteina Pds1, un reglator al coeziunii cromatidelor-surori (după Lowndes și Murguia, 2000).

Ipoteza conform căreia, la *S.cerevisiae,* proteina Rad24 ar putea funcționa analog factorului RFC, prin activitatea de încărcare a proteinelor specifice structurii ADN, este confirmată de interacțiile dintre subunitățile specifice RFC și Rad24. Studiile recente au arătat că complexul Rad24 conține subunitățile Rfc2, 3, 4 și 5 dar nu și Rfc1, fapt ce sugerează că Rad24 substituie Rfc1 într-o versiune alternativă a complexului RFC specific pentru o structură necunoscută. Utilizând analogia cu complexul RFC, această structură ar putea asigura tranziția de la ADN dublucatenar la ADN monocatenar, în contextul proteinelor de reparare a ADN ce produc această structură (Fig. 73.).

Deși gena *rad9* s-a identificat că fiind o genă *checkpoint*, încă nu se stie cum această ramificație a căii de control dependentă de lezarea ADN sesizează ADN-ul deteriorat. Analiza secventei primare a proteinei Rad9 evidențiază prezenta unui domeniu tandemic BRCT plasat la capătul carboxi-terminal, domeniu prezent și la alte proteine cu rol în metabolismul ADN (supresorul tumoral BRCA1- *breast cancer associated 1*). Acest domeniu BRCT este necesar pentru oligomerizarea proteinei Rad9 dependentă de

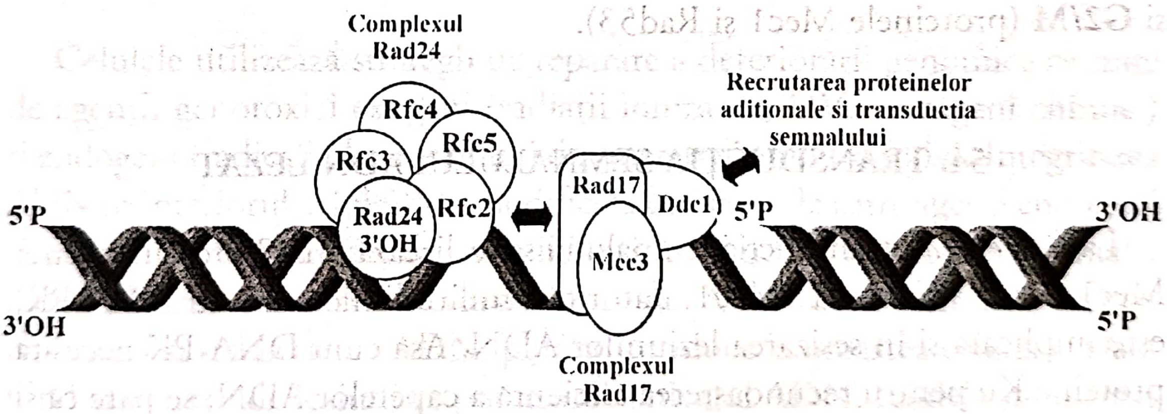


Fig. 73 — Funcția biochimică posibilă a grupului Rad24 de proteine checkpoint. Proteina Rad24, impreună cu cele 4 subunități mici ale RFC, este o componentă a unui complex pentameric. Prin analogie cu RFC, acest complex recunoaște tranziția dintre ADNmc și ADNdc. O astfel de structură este produsă de multe din căile de reparare, dar Rad24 poate recunoate eficient această structură doar in contextul complexelor reparatorii. O dată complexul Rad24 legat, acesta recrutează complexul de tip PCNA-like alcătuit din Rad17/Mec3/Ddc1 la ADN, urmată de recrutarea proteinelor checkpoint implicate în transducția semnalului (proteinele Mec1 și Rad53) (dupa Lowndes și Murguia, 2000).

deteriorarea ADN, oligomerizare necesară pentru funcția de *checkpoint*. BRCA1 și proteinele de la drojdii prezintă maniere similare de reglaj. Ambele sunt subiectul fosforilării dependente de Cdk în S/G2/M. Mai mult, acestea sunt hiperforforilate după deteriorarea ADN, această reglare fiind dependentă de clasa de kinaze Rad3/Mec1/ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), sugerând analogia de funcționare a BRCA1, Rad9 și Crb2 (omologul Rad9 de la *S.pombe*).

Bratele Rad9 și Rad24 ale căii de semnalizare funcționează aditiv, sesizând ADN-ul lezat prin mecanisme distincte. ADN-ul lezat pare să fie sesizat indirect prin interacțiile cu proteinele complexului de reparare NER. Această ipoteză generală conform căreia ADN-ul deteriorat este sesizat prin interacțiile dintre căile *checkpoint* și căile reparatorii este susținută și de studiile pe mutante NER-defective de la drojdii.

În cursul fazei **S**, atât deteriorarea cât și inhibarea sintezei ADN pot fi sesizate de mecanismele specifice fazei **S** ce implică în mod direct mașinăria de replicare (ADN pol∊, Dpb11, RFC5 și Drc1). O dată semnalul sesizat, acesta este transdus printr-o cascadă de fosforilare proteinică ce implică aceeași transductori folosiți de punctele de control al ADN lezat din **G1** și **G2/M** (proteinele Mec1 și Rad53).

54. TRANSDUCȚIA SEMNALULUI ADN LEZAT

La *S.cerevisiae*, transducția semnalului se realizează prin 3 protein-kinaze: Mec1, Rad53 și Dun1. Mec1, datorită similitudinilor sale cu DNA-PK, este implicată și în sesizarea leziunilor ADN. Asa cum DNA-PK necesită proteine Ku pentru recunoașterea eficientă a capetelor ADN, se pare că și Mec1 are nevoie de subseturi distincte de proteine adiționale pentru recunoaștereaa ADN lezat și inițierea semnalului *checkpoint*. Rad53 și Dun1 sunt protein-kinaze înrudite, activate de ADN-ul lezat sau de replicarea stagnantă și funcționează după Mec1. Date recente arată că, după lezarea ADN, Rad53 se leagă specific la Rad9 hiperfosforilată într-o manieră Mec1-dependentă, această interacție fiind mediată prin fiecare din cele două domenii FHA ale Rad53. Hiperfosforilarea Rad9 de către Mec1 crează situsuri cu resturi fosforilate specifice recunoscute și legate prin domeniul amino-terminal și carboxi-terminal ale Rad53. Întrucât Rad9 este un senzor al ADN lezat ce rămâne legat la cromatină, prin acest mecanism se recrutează Rad53 la leziuni, permitând amplificarea localizată a semnalului *checkpoint.*

Rad53 este fosforilată și după lezare, într-o manieră Mec1-dependentă dar, o dată activată de către Mec1, autofosforilarea lui Rad53 are loc în absența altor proteine. Deci, formarea unui complex nu este absolut necesară pentru a menține Rad53 în forma sa activă. Alte studii au arăt că Mec1 și Rad53 previn activarea originilor târzii ale replicării, atunci când bifurcația de replicare întâlneste leziunea din ADN. Forforilarea subunității B a complexului ADN polα-primaza, necesar inițierii sintezei ADN, este dependentă în mod normal de formele de ciclina B ale Cdc28 (Clb-Cdc28) și este represată prin activarea punctului de control al replicării S, derepresarea făcându-se în prezența unor nivele ridicate de proteină Rad53, și ea inhibată de punctul de cotrol S. Aceste date sugerează că complexul ADN polα-primaza este o țintă ulteriorară a Rad53 și că Clb-Cdc28 este modulată prin acest punct de control.

55. MECANISME REPARATORII ALE ADN LA *S.CEREVISIAE*

Celulele utilizează strategii de reparare a deteriorării genomice cauzate de agenții genotoxici exogeni (radiații ionizante, UV, mutageni chimici) și endogeni (radicali liberi rezultați din metabolismul oxidativ). Integritatea ADN în interiorul celulei este modificată constant de către agenți endogeni și exogeni. Datorită acestei instabilități în condiții fiziologice normale, ADN-ul suferă alterări structurale continue. Aceste deteriorări interferă cu replicarea și transcrierea ADN, putând conduce la moartea celulară. Dată fiind varietatea de leziuni ce pot apare la nivelul ADN, celulele și-au creat căi multiple de reparare a fiecărui subset de leziuni. Pe lângă repararea eficientă a ADN, activarea corectă a punctelor de control ale ciclului celuar este esențială pentru menținerea integrității genomice.

Punctele de control ale lezării ADN

Punctele de control reglează toate tranzițiile majore ale ciclului celular mitotic dar și câteva tranziții ale ciclului celular meiotic. Proteinele *checkpoint* joacă rol și în reglajul transcrierii și inducerea proceselor reparatorii ale ADN (Fig. 74.).

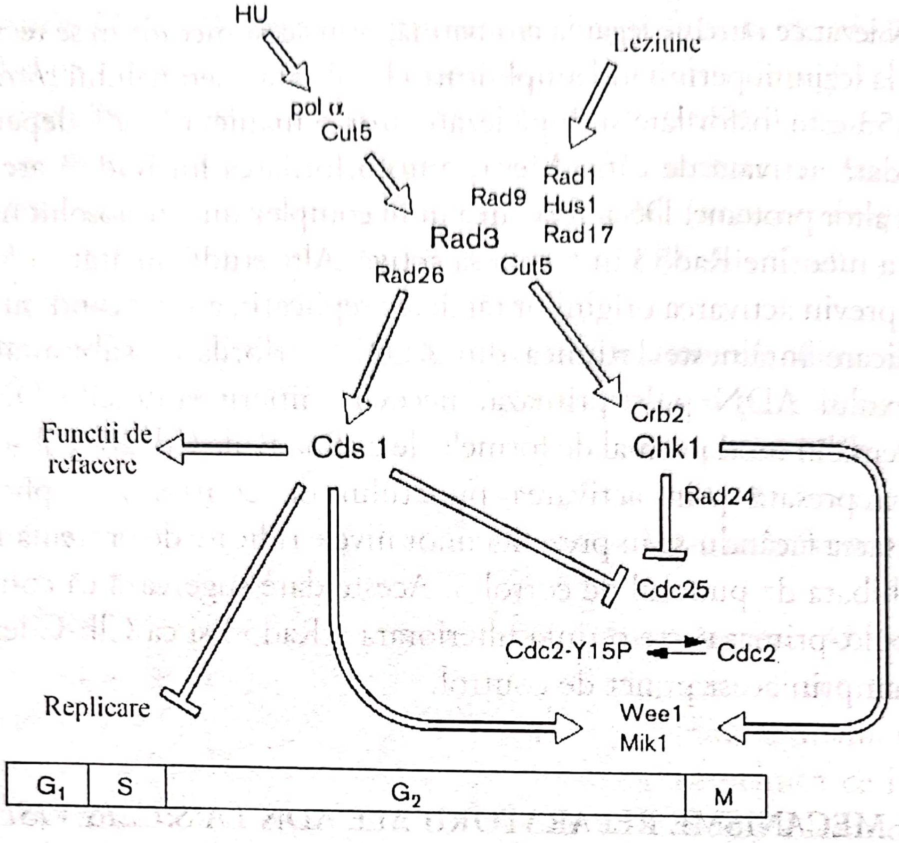

HU
Leziune
pol α
Cul5
Rad1
Hus1
Rad17
Rad9
Rad3
Rad26
Cul5
Crb2
Functii de refacere
Cds 1
Chk1
Rad24
Cdc25
Cdc2-Y15P
Cdc2
Replicare
Wee1
Mik1
G_1
S
G_2
M

Fig. 74 — Model de control prin proteine *checkpoint* la *S.pombe* (după Rhind și Russell, 1998).

56. PUNCTUL DE CONTROL G2/M AL LEZIUNILOR ADN DE LA *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

Acest punct de control previne separarea cromatidelor-surori care, în cazul prezenței ADN lezat sau a unei replicări incomplete, reprezintă un pas ireversibil către apoptoză - moartea celulară programată genetic. La *S.pombe* și vertebrate, acest punct acționează înaintea separării cromatidelor-surori, în momentul tranziției **G2/M,** și este reglat prin inactivarea Cdc2 ca urmare a fosforilării restului de Tyr.

Genele implicate în punctul de control **G2** a leziunilor ADN pot fi împărțite în trei grupe:

- gene *rad* ale punctului de control, implicate și în punctul **S/M** de control al replicării;
- gene specifice punctului de control G2 al lezării ADN;
- genele țintă care sunt componente normale ale mașinăriei mitotice.

Genele *rad* includ: *rad1, rad3, rad9, rad17, rad26* și *hus1*. Acestea sunt necesare tuturor punctelor de control a ADN. Produșii genelor *rad* pot servi și ca transductori de semnal și sunt direct implicați în recunoașterea ADN-ului lezat, unele fiind similare proteinelor implicate în metabolismul ADN (Tabel 8.).

Tabel. 8. Proteine *checkpoint* și de reparare a ADN în cursul diviziunii mitotice. RFC- factorul de replicare C (*replication factor C*), ATM – mutația genei pentru ataxia telangiectasia (*Ataxia Telangiectasia mutated*), motivul BRCT (motiv carboxi-terminal al BRCA (*Breast Cancer susceptibility gene* – gena de susceptibilitate pentru cancerul mamar). Domeniu FHA (domeniu asociat capului bifurcației de replicare - *forkhead associated domain*) (după Rhind și Russell, 1998).

	Omologi Alte drojdii	*checkpoint* Om	Funcție/ Similitudini
S.pombe			
Reparare și replicare			
Rad1	Rad17	hRad1	Exonuclează
Rad9	Ddc1	hRad9	
Rad17	Rad24	hRad17	Similar cu RFC
Rad26			
Reparare			
Chk1	Chk1	hChk1	Serin-treonin-protein kinază
Crb2	Rad9		Motiv BRCT
Replicare			
Pol1			ADN polimeraza α
Cds1	Rad53		Serin-treonin-protein kinază cu 1 domeniu FHA
Ținte			
Wee1		hWee1	Cdc2 kinază
Cdc25		Cdc25C	Cdc2-fosfatază

	Omologi	*checkpoint*	Funcție/ Similitudini
	Alte drojdii	Om	
S. cerevisiae			
Reparare și replicare			
Mec1	Rad3	ATM	Protein kinază ADN - dependentă
Rad53	Cds1		Serin-treonin-protein kinază cu 2 domenii FHA
Reparare			
Rad9	Crb2		
Rad17	Rad1	hRad1	Exonuclează
Rad24	Rad17	hRad17	Similitudine limitată cu RFC
Ddc1	Rad9	hRad9	
Replicare			
Pol2	Cdc20	Pol ϵ	ADN polimeraza ϵ
Dpb11	Cut5		Secvente repetitive
Rfc5			Subunitatea mică a RFC
Ținte			
Pds1	Cut2		Inhibitor al Anafazei

Proteina Rad1 este omologă exonucleazei Rad1 umane (hRad1), iar Rad17 prezintă o similitudine limitată cu factorul C de replicare (RFC). Mai mult, la *S.cerevisiae*, omologii pentru Rad1 și Rad17 sunt implicați în procesarea ADN-ului lezat. O altă similitudine interesantă este cea a proteinei Rad3 cu protein-kinaza ADN-dependentă (DNA-PK) de la eucariotele superioare. DNA-PK este o enzimă alcătuită din trei subunități care se activează prin legarea sa la rupturile ADN mono- sau dublucatenare, fapt ce sugerează implicarea directă a DNA-PK în recunoasterea ADN lezat. Activarea eficientă a DNA-PK la rupturile ADN presupune participarea a două subunități reglatorii: Ku70 și Ku86. Subunitatea catalitică a DNA-PK este o protein-kinază particulară ce prezintă similitudini cu lipid-kinazele. Alți membri ai familiei protein-kinazelor ADN-dependente implicați în reglarea punctelor de control, sunt reprezentanți, la om, de ATM și ATR (ATM înrudită – *ATM related*) și de Mec1 la *S.cerevisiae.*

Activitatea Rad3 este reglată la rândul său de alte proteine Rad. De exemplu, Rad1, Hus1 și Rad 9 formează un complex heterotrimer reglator, stabil, ce funcționează independent de celelalte gene *rad checkpoint*. Proteina Hus1 este fosforilată ca răspuns la distrugerile ADN, fosforilare ce depinde de interacția cu Rad1, Rad9 și Rad3.

În clasa de gene *rad* este inclusă și gena *cut5*. Proteina Cut5 este necesară atât la punctul de control S/M, cât și la punctul de control al leziunilor ADN induse de radiațiile γ. În mod surprinzător, Cut5 nu influențează punctul de control al leziunilor induse de radiațiile UV, fapt ce sugerează existența unei diferențe între punctele de control ale leziunilor produse de radiațiile UV și γ.

Unul dintre rolurile proteinelor Rad în punctul G2 de control al ADN-ului lezat este de a regla serin-treonin-kinaza Chk1, fosforilată ca răspuns la deteriorările ADN. La acesta se adaugă și un rol independent de Chk1, acela de activare a reparării ADN.

Proteina nou identificată Crb2, ca și Chk1, este specifică punctului G2 de control al distrugerilor ADN și acționează după proteinele Rad. Ca și Rad9, proteina Crb2 conține un motiv BRCT prezent și în proteina 1 de legare la p53 (53BP1 – *p53 binding protein 1*) și proteina BRCA1, de la eucariotele superioare. Lezarea ADN activează prin fosforilare proteina Crb2, în punctul de control dependent de proteinele Rad, dar într-o manieră independentă de Chk1. Prin fosforilarea, Crb2 se eliberează și activează Chk1. Prin urmare, Crb2 acționează ca un mediator între proteinele Rad și Chk1.

Ținta ultimă a punctului de control G2 al leziunilorADN este fosforilarea tirozinei (Tyr) de la Cdc2 (kinază dependentă de ciclină- *cyclin-dependent kinase*). Într-o celulă normală, evoluția mitozei este reglată prin fosforilarea Cdc2 la Tyr15 care menține activitatea complexele Cdc2-ciclinaB la un nivel interfazic, suficient de ridicat pentru a iniția replicarea și pentru a preveni rereplicarea, dar prea scăzut pentru desfășurarea mitozei. Inactivarea Cdc2 presupune fosforilarea catalizată de kinazele Wee1 și Mik1 a restului Tyr15, iar activarea este mediată de fosfataza Cdc25. La granița G2/M se produce *shift*-ul activității kinazelor și fosfatazelor, în favoare defosforilării, Cdc2 este activată și mitoza se poate desfășura. În punctul de control indus de leziunile ADN, Cdc2 este menținută în forma tirozin-fosforilată, fosforilarea Tyr15 fiind obligatorie pentru blocarea ciclului celular la punctul de control.

Menținerea Cdc2 în forma interfazică tirozin-fosforilată presupune controlul activității Cdc25, Wee1, Mik1 și a combinațiilor acestora. De exemplu, Chk1 fosforilează Wee1 și Cdc25. Mai mult, analizele genetice au demonstrat inhibarea defosforilării Cdc2 de către Cdc25, prin inactivare sau printr-un mecanism care previne accesul Cdc25 la Cdc2. Controlul activității Cdc25 este asigurat de proteina Rad24 ce acționează ca reglator negativ al Cdc25, în cursul creșterii normale.

57. PUNCTELE DE CONTROL METAFAZIC ALE LEZĂRII ADN LA *S.CEREVISIAE*

La *S.cerevisiae*, evenimentele reglate de fosforilarea Tyr din Cdc2 (precum separarea corpilor polari ai fusului de diviziune (SPB) și formarea mugurelui) se desfășoară mult mai devreme, la finele fazei S. Prin urmare, perioada dintre faza S și mitoză se aseamănă mai mult cu o metafază decât cu faza G2.

S-au identificat 5 gene (*rad9, rad17, rad24, mec3* și *ddc1*) implicate în controlul metafazic al ADN deteriorat. Aceste gene pot fi împărțite în două grupe: primul grup include doar gena *rad9*, celelalte patru gene alcătuind grupul *rad24*. Proteinele grupului Rad24 au similitudini structurale cu proteinele implicate în metabolismul ADN și sunt necesare procesării ADN-ului distrus. Proteinele Mec3 și Rad53 sunt implicate și în punctul de control S/M, având un rol esențial și în menținerea viabilitatea celulei.

Proteina Rad53 este o protein-kinază ce conține la fiecare capăt câte un domeniu FHA (domeniu asociat capului bifurcației de replicare - *forkhead associated domain*) implicat în legarea altor proteine reglatoare. Rad53 este fosforilată ca răspund la lezarea ADN, fosforilarea fiind dependentă de Mec1, Rad9 și de proteinele grupului Rad24. Proteinele grupului Rad24 sunt similare structural cu proteinele implicate în metabolismul ADN și sunt necesare procesării ADN deteriorat.

Proteinele Rad9 și Ddc1 sunt fosforilate după distrugerea ADN, activarea lor făcându-se într-o manieră dependentă de Mec1. Rad9 și Ddc1 se asociază cu Mec1 în două complexe diferite, activează Mec1 și servesc ca substraturi

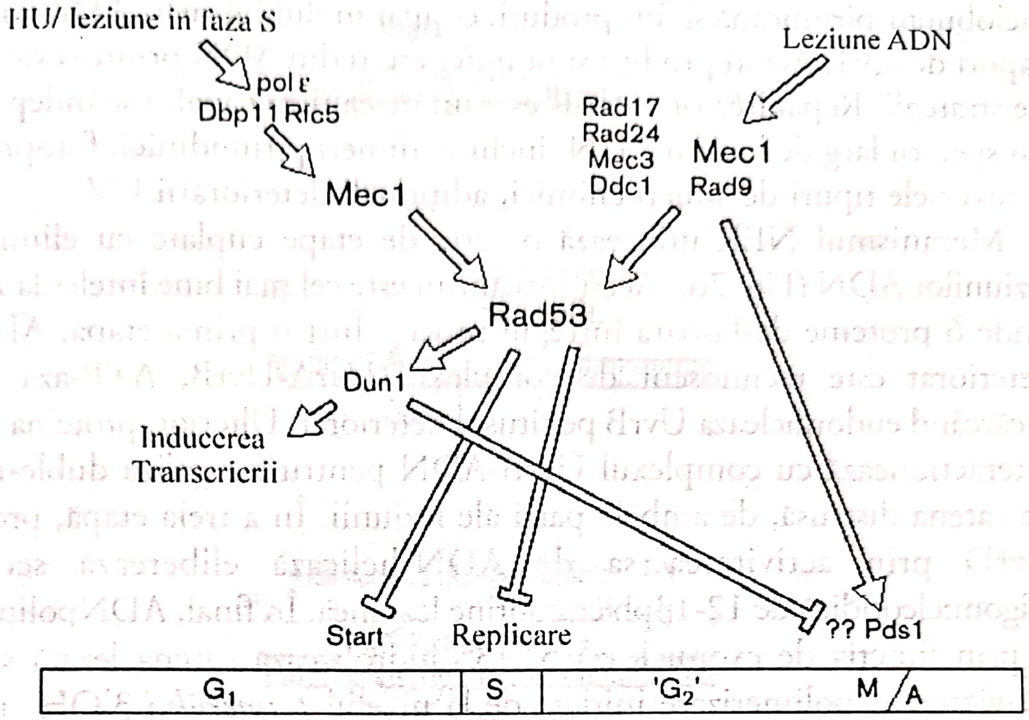

HU/ leziune in faza S
pol ε
Dbp11 Rfc5
Mec1
Leziune ADN
Rad17
Rad24
Mec3
Ddc1
Mec1
Rad9
Rad53
Dun1
Inducerea
Transcrierii
Start
Replicare
?? Pds1
G_1
S
'G_2'
M
A

Fig. 75 — Modelul controlului prin proteine *checkpoint* la *S.cerevisiae* (după Rhind și Russell, 1998).

de acțiune pentru aceasta. Proteina Rad9 are rol de adaptor care, fosforilată de Mec1, se asociază la cel de-al doilea domeniu FHA al proteinei Rad53 ce va fi fosforilată de Mec1.

Blocarea ciclului celular presupune și acțiunea punctului de control metafazic al ADN lezat asupra stabilității Pds1, reglator negativ al Anafazei care este degradat la tranziția Metafază–Anafază. Pds1 este stabilizat prin fosforilare, ca răspuns la lezarea ADN, într-o manieră Rad9- și Mec1-dependentă. Pe lângă stabilizarea Pds1, blocajul metafazic presupune și menținerea activității Cdc28, printr-un mecanism Rad53-dependent.

58. SISTEME DE REPARARE ADN LA *S.CEREVISIAE*

I. Repararea prin excizie de nucleotide (*Nucleotide Excision Repair - NER*) este cel mai important sistem de reparare a ADN, finalitatea sa fiind, în special, apărarea celulelor împotriva leziunilor ADN induse de radiațiile UV. Leziunile ADN induse de UV sunt dimeri de ciclobutan-pirimidină și fotoproduși, ce apar în dublul-helix ADN într-un raport de ~3:1. Acești produși sunt îndepărtați din ADN printr-o varietate de strategii. Repararea prin NER este un mecanism capabil să îndepărteze un spectru larg de leziuni ADN, inclusiv dimeri pirimidinici, fotoproduși și diversele tipuri de aducți chimici, adiționali deteriorării UV.

Mecanismul NER utilizează o serie de etape cuplate cu eliminarea leziunilor ADN (Fig. 76). Acest mecanism este cel mai bine înteles la *E.coli*, unde 6 proteine desfășoară întregul proces. Într-o primă etapă, ADN-ul deteriorat este recunoscut de complexul UvrA-UvrB, ATP-aza UvrA încărcând endonucleaza UvrB pe situsul deteriorat. Ulterior, proteina UvrC interacționează cu complexul UvrB-ADN pentru a cataliza duble-incizii pe catena distrusă, de ambele parți ale leziunii. În a treia etapă, proteina UvrD prin activitatea sa de ADN-helicază eliberează secvența oligonucleotidică de 12-13pb ce conține leziunea. În final, ADNpolimeraza I, prin funcția de exonuclează 5'→3', hidrolizează catena lezată și prin activitatea depolimerizare inițiată de la nivelul *primerului* 3'OH umple *gap*-ul ce va fi închis de ADN ligaza.

Unele trăsaturi ale acestui mecanism întâlnit la procariote se regăsesc și la eucariote, diferența esențială constând în mărimea oligonucleotidului excizat, care este de 27-32pb la eucariote. În plus, la eucariote, acest mecanism de reparare este mult mai complex din punct de vedere biochimic și genetic, cu peste 20 polipeptide participante.

Procesul de reparare este aproximativ identic în celulele de drojdii și celulele animale și constă în incizia ADN de ambele părți ale leziunii, cu îndepărtarea fragmentului oligonucleotidic, urmată de sinteza reparatorie și ligare.

Pe baza sensibilității UV a mutantelor defective în procesul de reparare prin excizie, s-au identificat cel puțin 7 proteine (Rad1, Rad2, Rad3, Rad4, Rad10, Rad14 și Rad25) implicate în primele etape ale căii reparatorii, toate aceste proteine având omologi cu funcții similare în mașinăria de reparare prin excizie de la mamifere. Alte proteine (Rad7, Rad16, Rad23, Rad24 și Mms19) sunt implicate în repararea preferențială a genelor transcrise, reglarea punctelor de control ale ciclului celular sau a modificării structurii cromatinei (Tabel 9.).

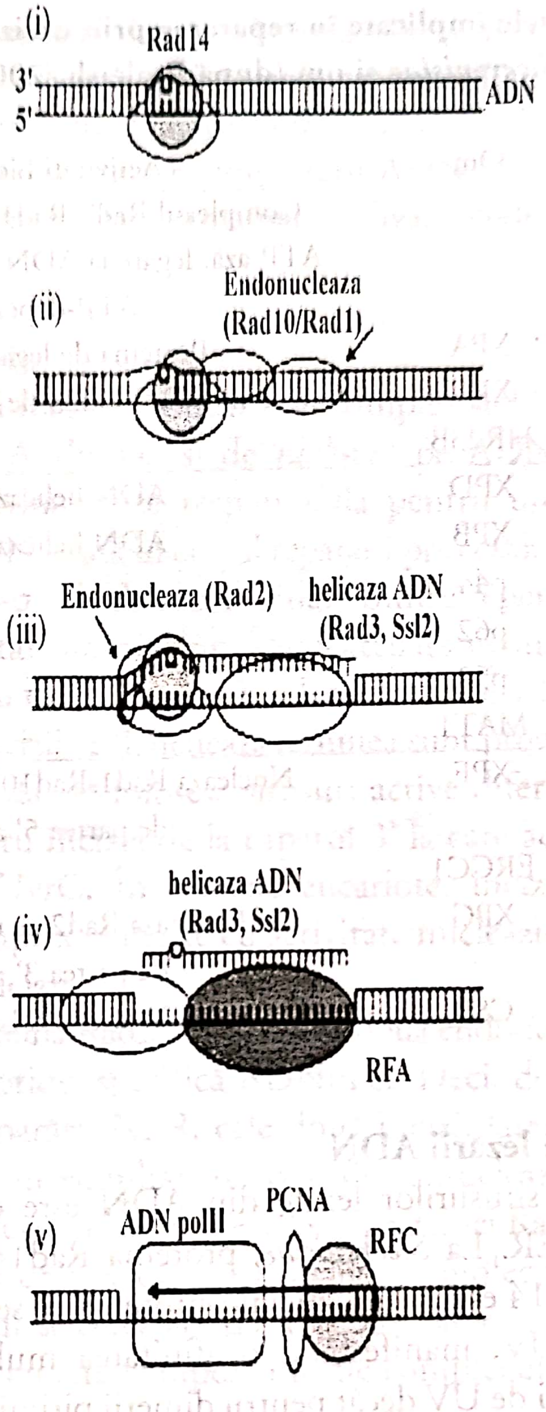

(i)
Rad14
3'
5'
ADN
(ii)
Endonucleaza
(Rad10/Rad1)
(iii)
Endonucleaza (Rad2)
helicaza ADN
(Rad3, Ssl2)
(iv)
helicaza ADN
(Rad3, Ssl2)
RFA
(v)
ADN polII
PCNA
RFC

Fig. 76 — Modelul mecanismului de repararea prin excizie de nucleotide a ADN lezat la *S.cerevisiae.* (i) recunoașterea unei leziuni în duplexul ADN. (ii) incizia catenei deteriorate pe una din părțile leziunii. (iii) îndepărtarea de către ADN helicaza a regiunii distruse și incizarea la celălalt capăt a leziunii. (iv) Îndepărtarea oligonucleotidului deteriorat prin activitatea ADN helicazei și a proteinei de legare la ADNm.c.. (v) Refacerea ADNd.c. prin activitatea ADN polII și închiderea de către ADN ligaza (după Aboussekhra și Wood, 1994).

Tabel 9. Proteinele implicate în repararea prin excizie de nucleotide la *S.cerevisiae* și om (după Prakash, 2000).

	S.cerevisiae	Om	Activitați biochimice
	Rad7	-	Complexul Rad7-Rad16 ADN-dependent
	Rad16	-	ATP-ază, legare la ADN lezat UV în manieră ATP-dependenta
	Rad14	XPA	Proteina de legare la leziune
	Rad4	XPC	Complexul Rad4-Rad23 de legare la ADN lezat UV
	Rad23	HR23B	
TFIIH	Rad3	XPD	ADN helicază 5'→ 3'
	Rad25	XPB	ADN helicază 3'→ 5'
	Ssl1	p44	-
	TFB1	p62	-
	TFB2	p52	-
	TFB3	MAT1	-
	Rad1	XPF	Nuclează Rad1-Rad10 ce taie ADN lezat de partea 5' a leziunii
	Rad10	ERCC1	
	Rad2	XPG	Nuclează Rad2 ce taie ADN lezat de partea 3' a leziunii
	Rad26	CSB	ATP-ază ADN-dependenta

Recunoasterea lezării ADN

Recunoașterea situsurilor lezate din ADN este o etapă esențială în repararea prin NER. La *S.cerevisiae*, proteina Rad14 este critică pentru această etapă. Rad14 este o zinc metalo-proteină ce se leagă preferențial la ADN-ul iradiat UV, manifestând o afinitatea mult mai mare pentru fotoprodușii induși de UV decât pentru dimerii pirimidinici de ciclobutan. Această preferință explică eficiența mult mai ridicată în îndepărtarea fotoprodușilor ADN decât a dimerilor pirimidinici.

O altă cale de recunoaștere a lezării ADN este abilitatea acesteia de a inhiba deplasarea enzimelor de tipul polimerazelor și helicazelor ce efectuează mișcări de translocație de-a lungul matriței ADN. Proteina Rad3 posedă o activitate de ADN helicază ATP-dependentă ce este puternic inhibată de lezarea ADN, în special de către lezarea UV și de alterările covalente de pe catena de legare a Rad3. Sechestrarea proteinei Rad3 la/în vecinătatea unei leziuni are rol în semnalizarea prezenței și localizării leziunilor din genom. Acest lucru crește rata recunoașterii ADN lezat, conducând la o intrare mult mai eficientă în faza următoare – clivajul endonucleolitic specific al ADN.

Proteine de incizie

Proteinele Rad1 și Rad10 formează un complex stabil și specific, cu rol de endonuclează pe ADNm.c. și de *nick*-ază pe ADNd.c. superrăsucit negativ. Această activitate este responsabilă pentru una dintre inciziile specifice în catena ADN lezată în cursul reparării prin excizie. Aceste proteine sunt implicate și într-o cale de recombinare dintre repetițiile directe de la drojdii, prin îndepărtarea capetelor monocatenare neomologe.

La *E.coli*, în cursul excizării oligonucleotidului de 12-13pb ce conține ADN lezat, ambele incizii ce flanchează leziunea sunt produse de complexul proteic UvrB-UvrC, dar se folosesc situsuri active diferite pentru fiecare incizie, un situs pentru incizia de la capatul 3' la care acționează UvrB și un situs 5' pentru UvrC. În celulele eucariote, inciziile sunt de ~30 nucleotide, două complexe diferite cu activitate nucleazică fiind implicate în medierea dublei incizii.

La *S.cerevisiae*, proteina Rad2 este cea de-a doua endonuclează de reparare prin excizie de nucleotide, specifică ADNm.c.. Deci, două nucleaze sunt necesare în cursul reparării NER, cele două incizii laterale leziunii fiind catalizate secvențial sau simultan de cele două nucleaze. Activitatea de endonucleaze a complexului Rad1-Rad10 și a proteinei Rad2 este nespecifcă pentru ADN-ul deteriorat, acestea acționând pe molecule monocatenare nedeteriorate. Clivajul selectiv al ADN deteriorat rezultă din interacția acestor endonucleaze cu alte componente ale complexului de reparare.

ADN helicaze

Cel puțin două ADN helicaze sunt implicate în procesul de reparare prin excizie, în celulele de *S.cerevisiae*: helicazele Rad3 și Rad25, ce translocă pe ADNm.c. în direcția 5'→3' și, respectiv, în direcția 3'→5'. De asemenea, Rad3 și Rad25 constituie două din cele șase subunități ale factorului transcripțional TFIIH.

Aceste două proteine sunt esențiale pentru viabilitatea celulară, proprietate care le distinge de celelalte proteine Rad. Rad3 și Rad25 sunt ADN helicaze ATP-dependente a căror activitate este implicată și în îndepartarea oligonucleotidului lezat după incizie și înainte de sinteza reparatorie.

Sinteza reparatorie a ADN și ligarea la *S.cerevisiae*

Repararea prin excizie de nucleotide folosește și proteine implicate în replicarea ADN: proteinele RFA și PCNA. RFA, similar omologului RPA de la om, este un complex proteinic trimeric de legare la ADNm.c. esențial pentru formarea și/sau stabilizarea structurilor intermediare incizate. PCNA este implicat în sinteza ADN prin umplerea *gap*-ului lăsat de oligonucleotidul excizat, fapt ce indică implicarea ADN pol II în sinteza reparatorie. De fapt, sinteza reparatorie a ADN presupune formarea unui complex alcătuit din RFA, PCNA, RFC și ADN polimeraza.

II. Repararea rupturilor ADN dublucatenare prin recombinare omologă

Rupturile dublucatenare sunt generate de radicali endogeni și de agenți exogeni precum radiațiile ionizante. Repararea este esențială pentru prevenirea fragmentării cromozomale, a translocațiilor și delețiilor.

La *S.cerevisiae*, calea predominantă de reparare a leziunilor ADN dublucatenare este recombinarea omologă. Analizele genetice ale efectelor radiațiilor ionizante la *S.cerevisiae* au permis identificarea genelor implicate în repararea rupturilor dublucatenare prin recombinare omologă. Această reparare necesita regiuni extinse de omologie a ADN, repararea cu acuratețe folosind informația genetică a cromatidei-surori intactă sau a cromozomului omolog (Fig. 77).

Genele a căror produși sunt componente ale acestei căi reparatorii aparțin grupului *rad52*: *rad50*, *rad51*, *rad52*, *rad55*, *rad59*, *mre11* și *xrs2*.

Proteina Rad51 este similară proteinei de recombinare RecA de la *E.coli*. RecA și omologul său Rad51 polimerizează pe ADN cu formarea unui segment nucleoproteinic se se asociază cu ADN-ul omolog, cu formarea unor molecule de unire între duplexurile ADN omologe, urmată de schimbul catenelor ADN.

Proteinele Rad55 și Rad57 formează un heterodimer care poate stimula schimbul de catene mediat de Rad51. Etapele care conduc la formarea moleculei de unire, mediate de Rad51, pot fi stimulate de o serie de factori accesorii, necesari pentru a anihila reacțiile de competionare existente în celula. Adițional complexului Rad55-Rad57, Rad52 are rol important în stimularea Rad51, promovând reasocierea monocatenelor ADN complementare și funcționează ca mediator între Rad51 și proteina RP-A de legare la ADNm.c., ce stimulează schimbul de catene ADN mediat de Rad51.

Rad54 este un alt element cheie al mașinăriei de recombinare omologă, ce funcționează ca o ATP-ază ADN-dependentă și aparține familiei Snf2-Swi2 de proteine, ai cărei membri sunt implicați în numeroase aspecte ale metabolismului ADN, precum transcrierea, recombinarea și repararea. Rad54 intercaționează cu Rad51, stimulând formarea moleculelor unite.

Proteinele Rad50, Mre11 și Xrs2 formează complexul MRX necesar pentru rupturile dublucatenare specifice meiozei, care sunt reparate ulterior prin recombinarea cu cromozomii omologi. În plus, aceste proteine sunt necesare și pentru unirea capetelor ADN.

Analizele biochimice ale factorilor implicați în unirea capetelor ADN au reușit să elucideze mecanismul acestei reacții de reparare. La nivelul capetelor ADN se leagă cu mare afinitate un heterodimer alcătuit din Ku70 și Ku80, aceasta afinitate ridicată sugerând rolul acestui heterodimer în recunoaștere și procesare. În plus, heterodimerul Ku joacă rol și în juxtapunerea celor două capete ADN. Dupa legarea la un capat al ADN, Ku poate atrage subunitatea catalitică a protein-kinazei DNA-PK, polipeptid de 465kDal ce prezintă la capătul C-terminal un domeniu protein-kinazic. DNA-PK este o forforilază capabilă și de autofosforilarea subunității catalitice ce conduce la inactivarea activității sale de protein-kinază, datorită afinității scăzute a DNA-PK pentru heterodimerul Ku. După atragerea subunității catalitice, capetele ADN sunt aduse în vecinate, iar molecula de DNA-PK de pe un capăt ADN fosforilează subunitatea catalitică localizată pe celălalt capăt. Aceasta transfosforilare inactivează activitatea kinazică, abrogând astfel posibilele funcții de semnalizare. În plus, fosforilarea poate conduce la remodelarea complexului proteinic de pe capetele ADN, permitând accesul altor factori de reparare la nivelul rupturiiADN (Fig. 78).

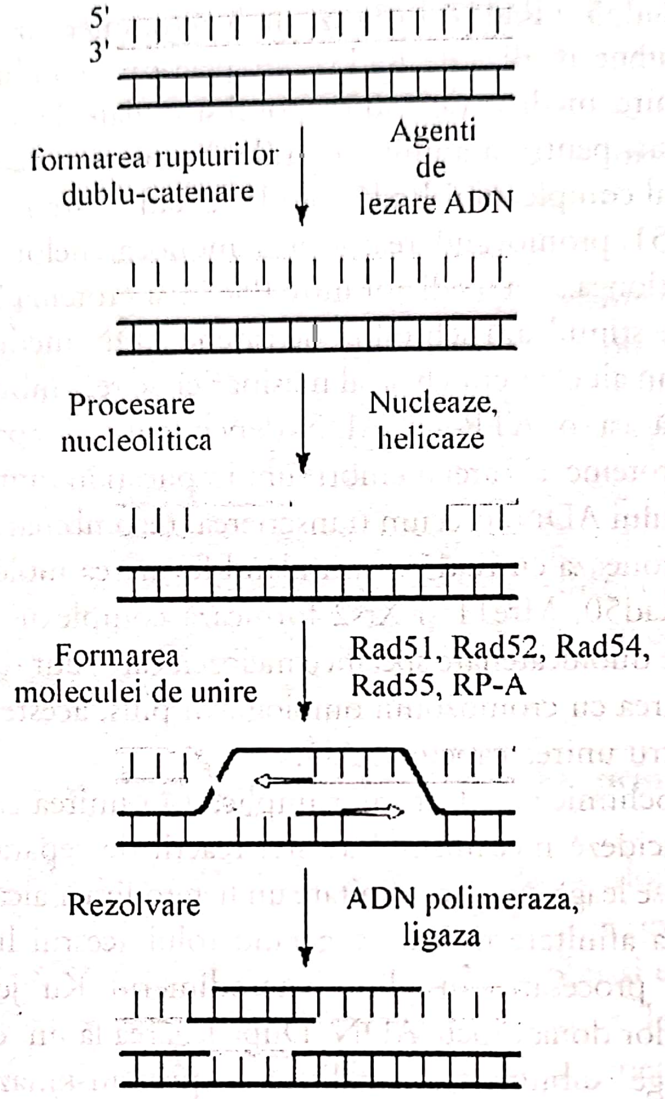

5'
3'
formarea rupturilor dublu-catenare
Agenti de lezare ADN
Procesare nucleolitica
Nucleaze, helicaze
Formarea moleculei de unire
Rad51, Rad52, Rad54, Rad55, RP-A
Rezolvare
ADN polimeraza, ligaza

Fig. 77 — Repararea rupturilor dublucatenare prin recombinare omologă. O ruptură dublucatenară poate fi generată de către agenți de lezare a ADN sau prin replicarea ADN ce conține o ruptură monocatenară. Ruptura dublucatenară este procesată la o regiune monocatenară, cu un capăt 3' lung, de către o nuclează, o helicază sau ambele. Proteina Rad51 polimerizează pe ADN monocatenar cu care formează un filament nucleoproteic ce se asociază cu duplexul ADN omolog. După găsirea duplexului omolog, schimbul de catene ADN generează o moleculă de unire între duplexul ADN deteriorat și duplexul omolog intact. Aceste etape, pe lângă Rad51, presupun acțiunea coordonată a proteinelor Rad52, Rad54, Rad55 și a proteinei de replicare RP-A (*Replication Protein A*) – proteină de legare la ADNm.c.. După sinteza ADN, ce presupune acțiunea ADN polimerazei însoțită de factorii accesorii, ligaza reface informația lipsă. În final, cele două duplexuri ADN devin intacte prin acțiunea unei rezolvaze care acționează la nivelul catenelor încrucișate (joncțiunile Holliday) (după Kannar și Gent, 1998).

Tabel. 10. Proprietăți ale proteinelor căii de reparare a rupturilor ADN dublucatenare prin recombinare omologa (după Kannar și Gent, 1998) .

Sursa			Interacție	Funcție biochimică
E.coli	*S.cerevisiae*	Om		
RecA	Rad51	hRad51	Rad52, Rad54, BRCA1, BRCA2	Asociere cu ADN omolog, schimb de catena ADN
-	Rad52	hRad52	Rad51	Legare la ADNmc; mediator al schimbului de catene.
-	Rad54	hRad54	Rad51	ATP-ază ADN-dependentă; promovează imperecherea omologilor ADN de către Rad51
-	Rad55	XRCC2, 3 Rad51	Rad57	Legare la ADNmc; formează heterodimerul Rad55-Rad57 ce funcționează ca mediator în schimbul de catene
-	Rad59	-		Legare la ADNmc și despiralizare
SbcC	Rad50	hRad50	Mre11, Xrs2, NBS1	Legare la ADN; formează complexul MRX cu Mre11 și Xrs2
SbcD	Mre11	hMre11	Rad50, Xrs2, NBS1	Endonuclează ADNmc, exonuclează 3' → 5'
-	Xrs2	NBS1	Rad50, Mre11	Conține domenii BRCT
	Ku70 (Hdf1)	Ku70	Ku80 DNA-PK, Sir4	Legarea capetelor ADN
	Ku80 (Hdf2)	Ku80	Ku70 DNA-PK	Legarea catenelor ADN
	DNAPK		Ku70, Ku80	Protein-kinază
	Lig4	ADN ligaza IV	XRCC4	Conține doua domenii BRCT
Lif1	XRCC4	ADN (Lig4)		ligaza IV

Structura cromatinei aduce un plus de complexitate procesului de reparare prin unirea capetelor ADN. De exemplu, La *S.cerevisiae,* proteinele Sir sunt necesare menținerii unei anumite structuri a cromatinei ce represează transcrierea la nivelul telomerelor. O astfel de structură a cromatinei se pare că facilitează unirea capetelor ADN.

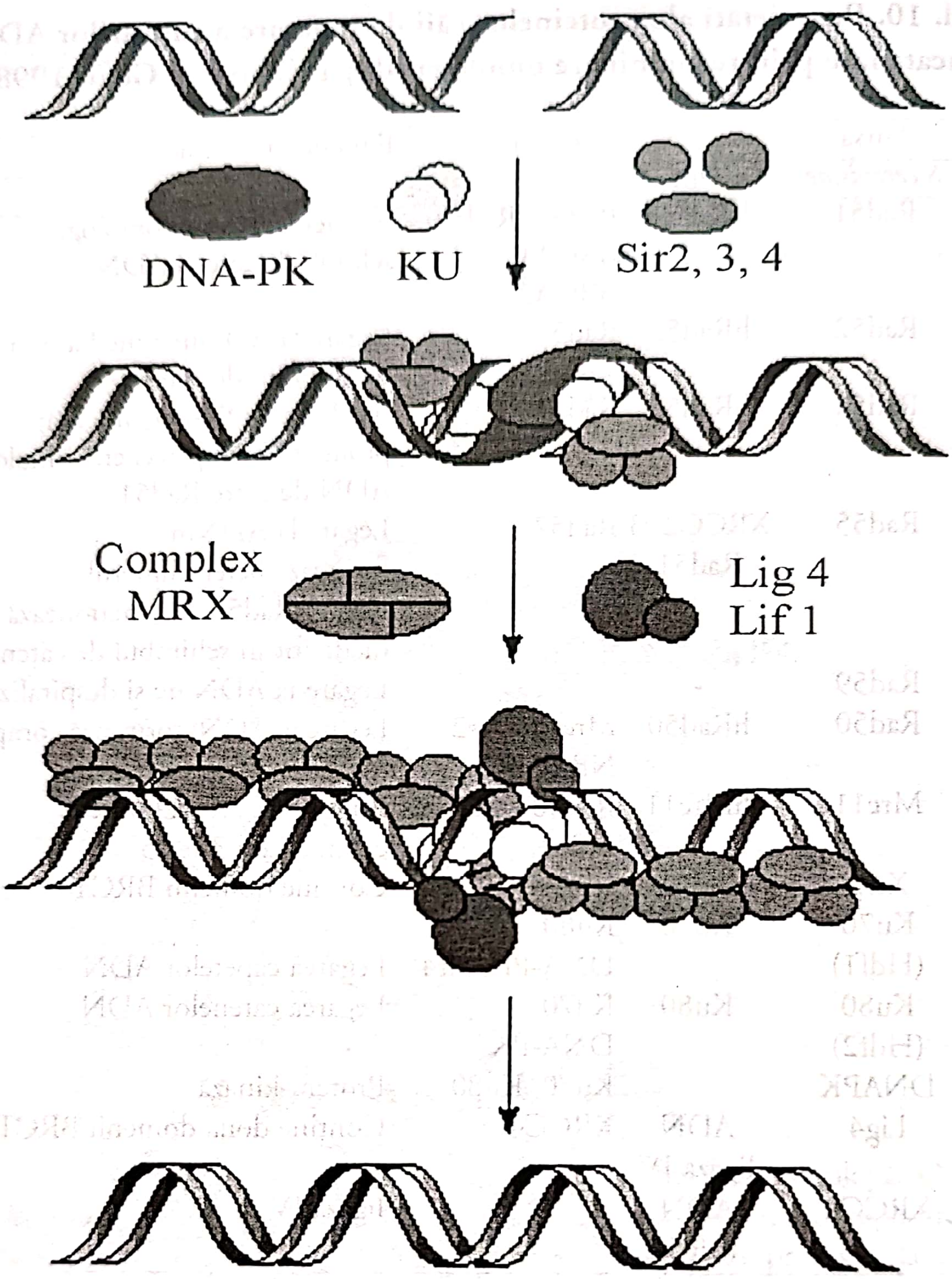


Fig. 78 — Modelul de reparare a rupturilor dublucatenare prin unirea capetelor ADN la *S.cerevisiae*. După apariția rupturii, heterodimerul Ku se leagă la capetele ADN și atrage DNA-PK. Concomitent cu aceasta, structura cromatinei poate fi influențată de proteinele Sir2, 3 și 4. Ulterior, capetele sunt unite, protomerii DNA-PK fosforilând fiecare capăt, determinând o schimbare în structura complexului ce conduce la îndepărtarea sa. În fazele târzii ale procesului reparator, este atras complexul RMX (ce conține Rad50, Mre11 și Xrs2), ce va procesa capetele ADN. În sfârșit, complexul format din ADN ligaza Lig4 și Lif1 reunește catenele (după Kannar și Gent, 1998).

III. Repararea rupturilor ADN dublucatenare prin unirea capetelor ADN neomologe

Unirea capetelor ADN neomologe (*NHEJ – Non-Homologous End-Joining*) reprezintă o altă cale de reparare a leziunilor ADN dublucatenare, net distinctă de calea de reparare prin omologie de secvență, doarece nu necesită omologie între cele două molecule ADN ce se recombină.

Componentele proteinice implicate în această cale sunt conservate la drojdii și celulele de mamifere (Tabel 11.).

Proteinele Ku joacă un rol esențial în procesul de reparare, fiind primele proteine de reparare care se localizează la nivelul rupturii ADN. După localizare, Ku recrutează complexul proteinic Sir la situsul de deteriorare, inducând formarea unei cromatinei de tip silențiată. Procesarea ADN

Tabel 11. Proteinele implicate în calea de reparare a rupturilor dublucatenare prin unirea capetelor ADN neomologe la *S.cerevisiae* și celule umane (după Critchlow si Jackson, 1998).

Om	Drojdii	Proprietăți
Ku70	Ku70	Heterodimerul Ku70-Ku80 conține componentă de legare la capatul ADN a DNA-PK; este necesară pentru repararea eficientă
Ku80	Ku80	
DNA-PK	-	Conferă funcție catalitică protein-kinazei ADN-dependente
XRCC4	Lif1	Intercaționează specific și puternic cu ADN ligaza IV; Lif1 stabilizează Lig4
ADN ligaza IV	Lig4	Activitate de legare la capetele ADN, se asociază cu XRCC4, respectiv cu Lif1
RAD50	Rad50	Intercaționează cu Mre11, prezintă omologie cu exonucleaza SbcC ATP-dependentă de la E.coli
MRE11	Mre11	Omologie cu exonucleaza SbcD ATP-dependentă. Mre11 are activitate de exonuclează 3'→5'
NBS1	Xrs2	Interacționează cu complexul MRE11(Mre11)
SIR2	SIR2	Silențiere transcripţionala, formează un compplex cu Sir2 si Sir4
	SIR3, SIR4	Sir4 interacționează cu Ku70

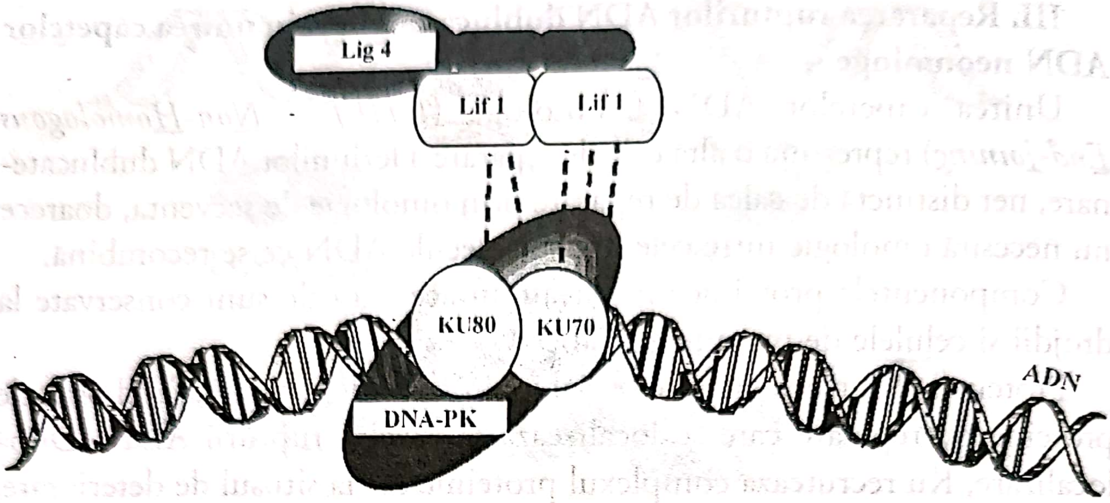


Fig. 79 — Modelul reparării rupturilor dublucatenare prin unirea capetelor ADN neomologe la *S.cerevisiae*. Heterodimerul Ku70-Ku80 se leagă la capetele ADN libere, după care recrutează complexul Sir, complexul MRX necesar procesării ADN și dimerul Lif1 care, la rândul sau, recrutează și activează ADN ligaza Lig4 (după Critchlow și Jackson, 1998).

prealabilă ligării este realizată de complexul MRX (factorii Rad50, Mre11 și Xrs2) recrutat de către proteinele Ku. După procesarea capetelor ADN, urmează etapa de ligare a ADN - etapă enzimatică cheie în calea NHEJ (Fig. 79.).

S.cerevisiae posedă doua ligaze ATP-dependente: ligaza I (Cdc9) - omologă ADN ligazei I de mamifere - și ligaza Lig4 - omologă ADN ligazei IV de mamifere. Ligaza I este necesară pentru unirea fragmentelor Okazaki în cursul replicării ADN și este implicată și în diferitele forme ale reparării ADN. Ligaza Lig4 este implicată în repararea prin calea NHEJ. Recrutarea Lig4 sau activarea funcției catalitice este mediată de interacția cu Lif1 (*Ligase-interacting factor 1*).

59. STRUCTURA CROMATINEI ȘI REPARAREA RUPTURILOR DUBLU-CATENARE

Repararea rupturilor dublucatenare prin unirea capetelor neomologe necesită heterodimerul Ku70-Ku80 ce se asociază capetelor ADN. Heterodimerul Ku se leagă și la nivelul TEL unde contribuie la integritatea structurii telomerice, localizarea nucleară a capetelor cromozomilor și TPE. Heterodimerul Ku interacționează cu Sir4 și cooperează cu RAP1 legată la TEL, în vederea recrutării proteinelor Sir pentru silențierea cromatinei. Dupa lezarea ADN, heterodimerul Ku se disociază parțial de la TEL, într-o manieră dependentă de punctul de control al deteriorării ADN, și se relocalizează la situsurile genomice interne ce conțin rupturi ADN dublucatenare. Similar, Sir3 și Sir4 se relocalizează cu proteinele de legare la capetele ADN. Interpretarea participării proteinelor Sir în repararea ADN, pentru moment, este speculativă. Una din teorii presupune ca proteinele Sir formează o structură de tip heterocromatină care ajută la ligarea ADN, prin oferirea unui eșafod („*scaffold*") adițional ce menține capetele rupte impreună. Într-o altă teorie, proteinele Sir recrutează factori de asamblare a cromatinei ce refac structura acesteia în jurul situsului de rupere. În ambele cazuri, concentrațiile ridicate de proteine Sir și Ku la nivelul TEL pot servi ca rezervoare rapid disponibile de proteine de reparare, în cazul apariției rupturilor dublucatenare în ADN.

Prezenta ADN împachetat în vecinatatea rupturilor dublucatenare are implicații asupra inactivării transcripționale și silențierii acestor regiuni. De exemplu, natura condensată a cromatinei previne transcrierea și/sau replicarea, prin accesul său și interferarea cu procesul de reparare a ADN. În plus, formarea cromatinei condensate la situsul rupturii dublucatenare exclude nucleazele non-specifice și previne astfel pierderea informației genetice. De asemenea, cromatina condensată poate stopa capetele ADN de la angajarea lor într-o recombinare nedorită cu alte molecule ADN. Alternativ, condensarea ADN ajută la juxtapunerea celor două capete, facilitând ligarea lor și prevenirea leziunilor ce ar da naștere unui cromozom rupt, care ar fi mult mai dificil de reparat.

Pe lângă funcția de reparare a ADN, multe dintre proteinele căii NHEJ sunt implicate în menținerea lungimii TEL și în silențierea transcripțională asociată TEL.

CAPITOLUL XXIV

GENOMUL FUNGILOR

Studiul genomului fungal prezintă multe dificultăți datorită dimensiunilor mici, complexității organizării și funcționării sale și particularităților distinctive ale sale față de genomul celorlalte grupe de organisme. Cromozomii fungilor sunt de dimensiuni foarte mici, cel mai adesea punctiformi, greu de evidențiat prin tehnicile utilizate în studiul cromozomilor la alte grupe de eucariote. Cromozomii fungilor sunt cel mai adesea Feulgen-negativi, astfel că trebuiesc utilizați alți coloranți pentru evidențierea lor.

Nici microscopia electronică nu a adus suficiente înlesniri în studiul organizării cromozomilor la fungi, cu excepția studiului cromozomilor meiotici la *Neotiella rutilans*, la care Westergaard și Wettstein (1970) au evidențiat cele mai clare complexe sinaptonemale, cu structură triplu axială și un element central foarte evident. La fungi, numărul de cromozomi a fost stabilit nu prin tehnici citologice, ci dedus pe bază de analiză genetică, considerându-se numărul grupelor de linkage.

Specia *Dictyostelium discoideum* constituie specia de fungi cea mai studiată la nivel molecular, la aceasta evidențiindu-se rolul gradientelor cAMP în autoasamblarea celulelor corpului multicelular. Alte date referitoare la organizarea genomului fungal sunt prezentate în diferitele capitole ale lucrării. În capitolul de față mă voi axa pe aspectele organizării aparatului fusorial implicat în dinamica cromozomală din diviziunea celulară.

De mulți ani, structura și comportamentul cromozomilor la fungi a reprezentat un subiect de cercetare pentru numeroși citologi, deoarece la fungi cromozomii sunt foarte mici și se observă greu la microscop datorită diferențelor în proteinele cromozomale comparativ cu cele ale organismelor superioare, ca și gradului mai redus de condensare cromozomală în timpul mitozei, față de alte organisme. În plus, unele specii de fungi prezintă un aranjament randomic al cromozomilor metafazici, cu absența plăcii ecuatoriale. La aceste specii, cromozomii sunt dispersați, în grade diferite, de-a lungul fusului de diviziune. La un număr de specii, precum *Plasmodiophoromycetes*, *Chytridiomycetes* și *Hyphochytridiomycetes*, cromozomii formează placa ecuatorială metafazică, dar nu există o separare evidentă a cromozomilor. Această împachetare cromozomală strânsă persistă și în anafază, până în telofază, când nucleii fii conțin numeroși kinetochori și sunt penetrați de microtubuli non-cromozomali.

La *Saprolegnia ferax*, în profaza timpurie, 6 din cei 38 de kinetochori (săgeata) formează un singur grup situat adiacent perechii de centrioli) care sunt încă nereplicați (săgețile groase) (fig. 1.a). După replicarea centriolilor, în interiorul nucleului, adiacent fiecărei perechi de centrioli, se află un aranjament hemisferic de kinetocori, care formează două grupe distincte, dar ușor suprapuse, una conținând 22 de kinetocori și cealaltă — 23 de kinetocori. Nu există nicio împerechere între kinetocorii grupelor învecinate. În metafaza timpurie, centriolii (săgețile groase) se află în afara membranei nucleare, la polii fusului, în timp ce kinetocorii (săgeți), dintre care unii împerechiați (săgețile 1 și 2), se află în fus (fig. 1.b.).

Tratamentul cu Oncodazol, un medicament care cauzează pierderea multor microtubuli citoplasmatici, provoacă separarea centriolilor (fig. 2).

După metafază, microtubulii cromozomali se scurtează substanțial, astfel că, în telofază, sunt foarte scurți și se află la polii fusului, înainte de a dispărea în interfază (fig. 3 și 4).

La *Thraustotheca* se formează microtubuli citoplasmatici între centriolii în curs de separare, iar elongarea lor permite deplasarea centriolilor.

La fungi, mitoza se caracterizează prin prezența unui fus intranuclear, precum și a unor structuri diferențiate pe sau asociate membranei nucleare, în timpul interfazei. Cel mai adesea, aceste structuri sunt denumite corpuri polare fusoriale — centre organizatoare de microtubuli (structuri capabile de a nuclea tubulina polimerizată, astfel încât să formeze microtubuli). La unele *Mastigomycotine* si la unele *Zygomycotine*, corpuri polare fusoriale apar ca elemente membranare ale anvelopei nucleare, cu densitate electronică crescută, și/sau sub forma unui strat de material electron-dens, asociat membranei nucleare interne. La alte *Mastigomycotine*, corpul polar

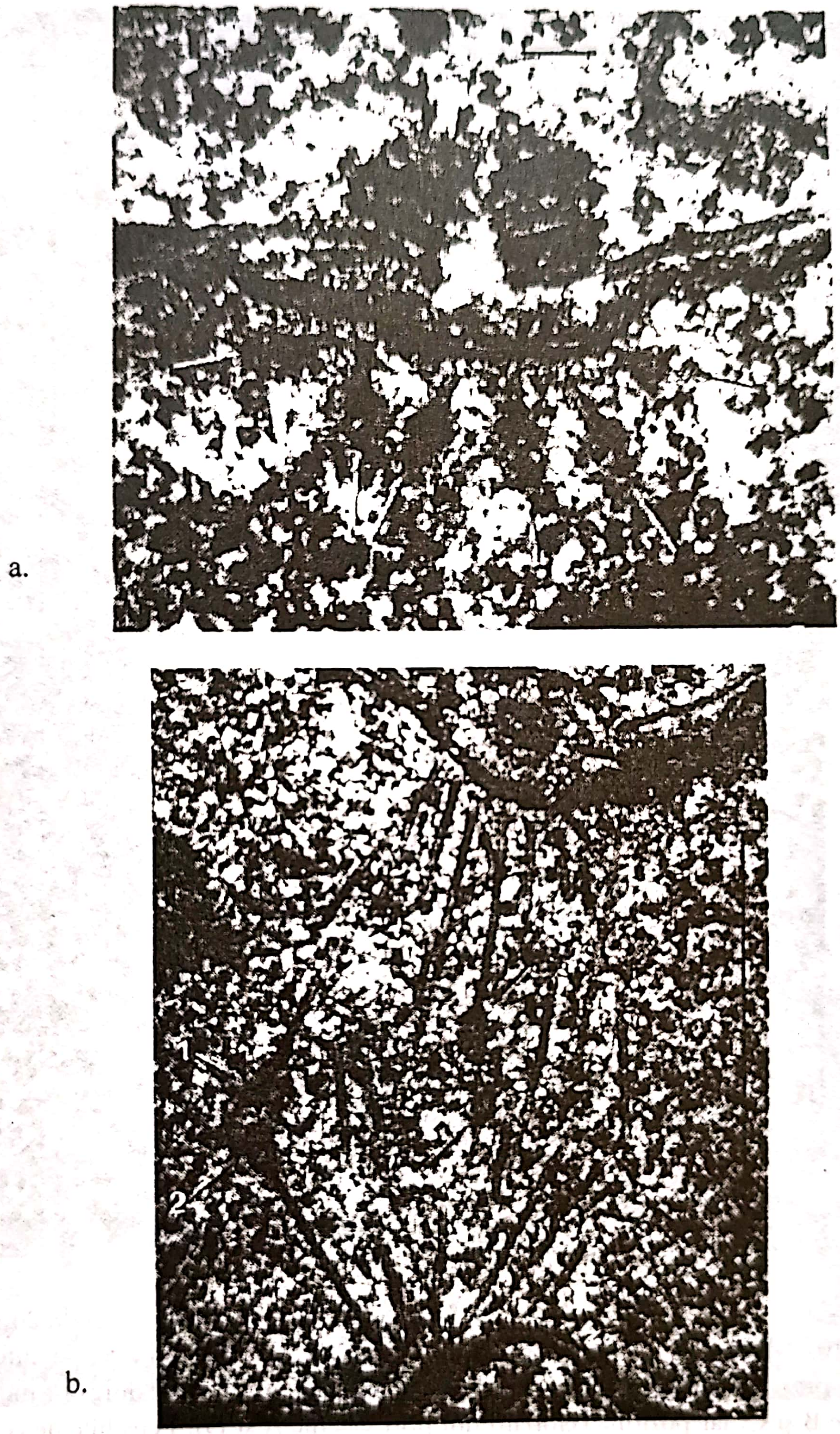


Fig. 1 — *Saprolegnia ferax* – profază (a) și metafază (b). Linia = 0.1 μm (după Heath,1978).

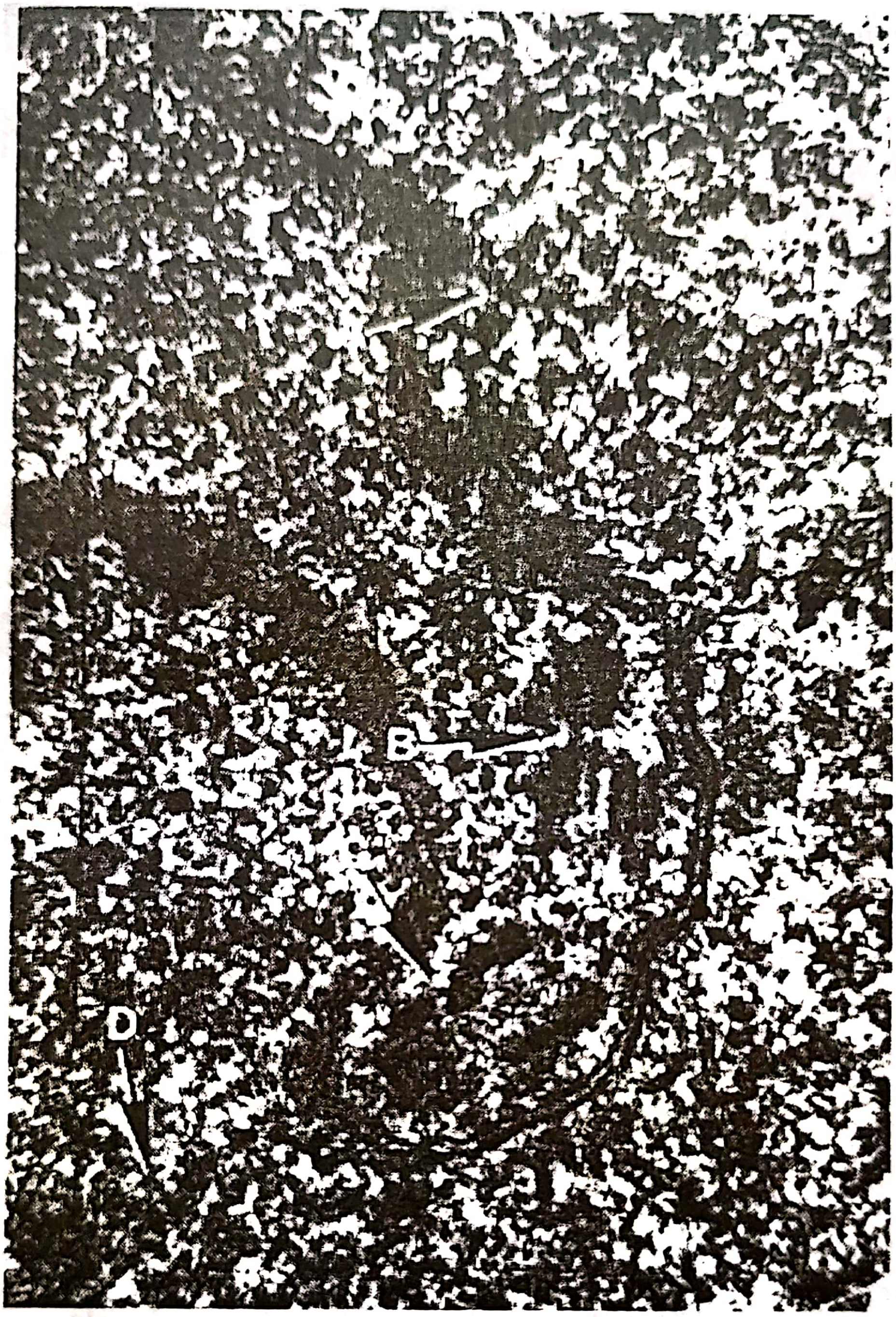


Fig. 2 — *Saprolegnia ferax.* Nucleul și centriolii unei hife tratate timp de 24 de ore cu 8.5 x 10^{-5} M Oncodazol. Nucleul a fost mărit vizibil, iar secțiunile seriale ulterioare au relevat prezența a patru perechi de centrioli adiacenți (dintre care doi sunt indicați prin săgețile B și C, iar pozițiile celorlalți doi prin săgețile A și D). Perechile de centrioli au fost adiacente câte unui set de microtubuli kinetocorali, fiecare conținând aproximativ câte un complement normal de kinetocori. Microtubulii citoplasmatici au fost aproape în întregime absenți. Linia = 0.1 µm (după Heath, 1978).

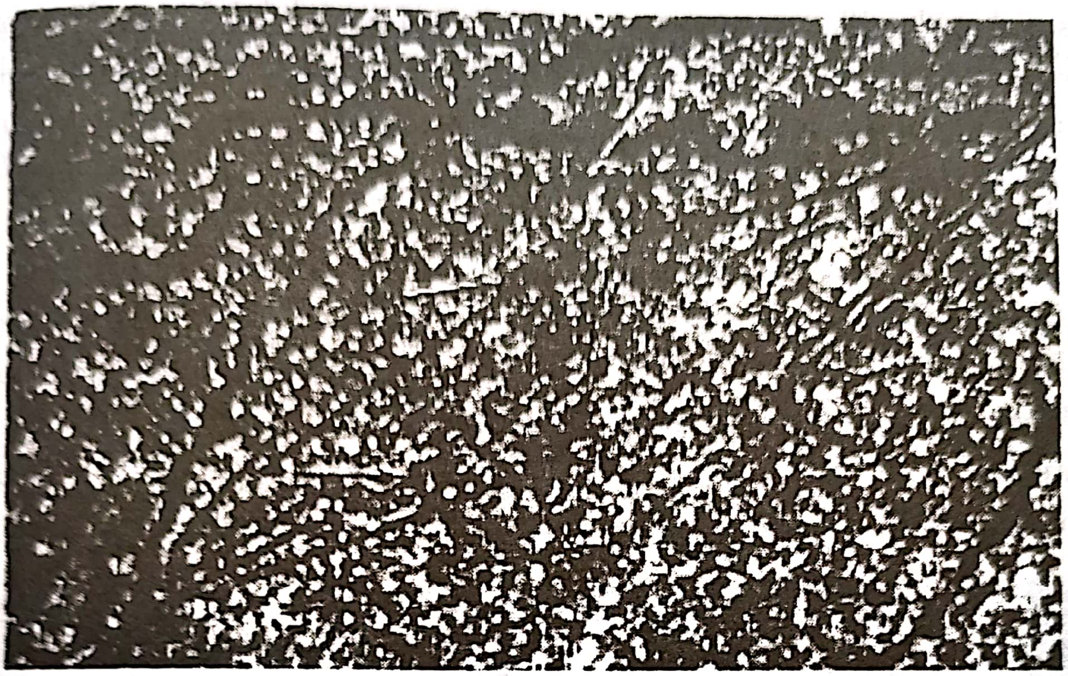


Fig. 3 — *Saprolegnia ferax.* Secțiune mediană longitudinală a fusului de diviziune metafazic, cu perechi de centrioli la fiecare dintre poli și numeroși kinetocori (săgețile). Linia = 0.1 µm (Heath, 1978).

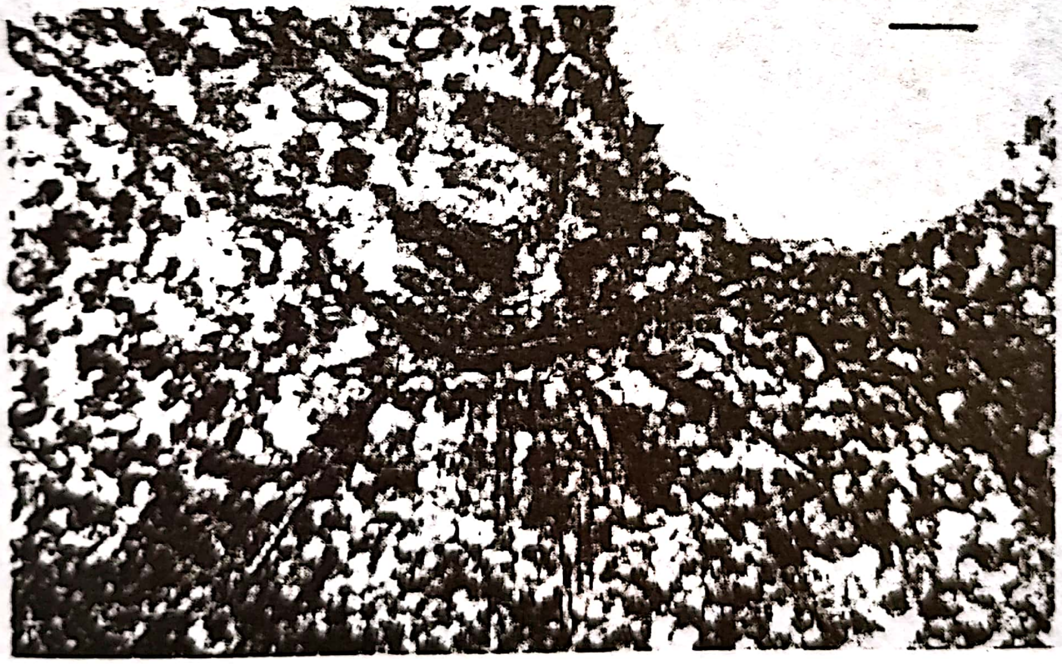


Fig. 4 — *Saprolegnia ferax.* Porțiune dintr-o regiune polară a fusului de diviziune telofazic, cu indicarea prin săgeți a kinetocorilor, aflați lângă membrana nucleară adiacentă centriolilor (săgețile groase). Linia = 0.1 µm (Heath, 1978).

fusorial se identifică cu o masă amorfă asociată centriolului. La alte *Eumycote* apar structuri mai complicate, de forme și consistențe variate. De exemplu, corpurile polare fusoriale discoidale sau tip placă sunt specifice *Ascomycotinelor*, în timp ce cei globulari sunt caracteristici *Basidiomycotinelor*.

În figura 5 sunt prezentate anafaza și telofaza speciei *Poria latemarginata*. În anafază, mișcarea cromozomilor reprezintă un mecanism intermediat de microtubuli, apoi de mișcarea mediată de membrană, în stadiul următor.

Girbardt (1971) susține posibilitatea persistenței unei conexiuni directe și intime între cromatină și corpii polari fusoriali, iar această conexiune este responsabilă, în principal, de distribuția în mod egal a cromatinei în nuclei fii. La marea majoritate a fungilor, distribuția

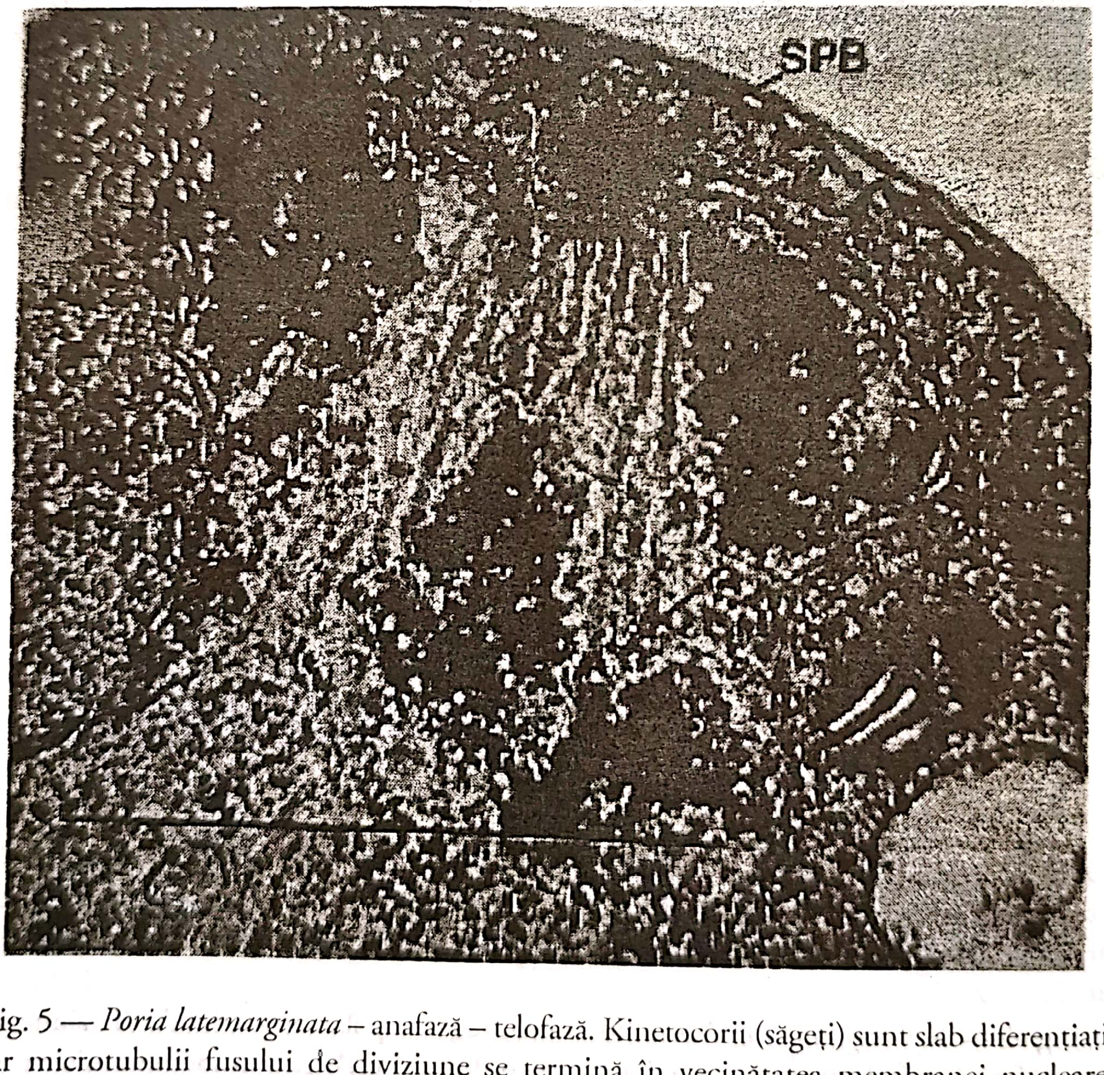


Fig. 5 — *Poria latemarginata* – anafază – telofază. Kinetocorii (săgeți) sunt slab diferențiați, iar microtubulii fusului de diviziune se termină în vecinătatea membranei nucleare. X 69.000 (după Setliff și colab., 1974).

cromozomilor în anafază este dependentă de o conexiune între cromozomi și microtubulii cromozomali.

La *Thraustotheca* și *Saprolegnia,* kinetocorii nu sunt dispuși în perechi în metafază. Microtubulii cromozomali interacționează cu cromozomii la nivelul kinetocorilor. Prezența microtubulilor interpolari sau continui la marea majoritate a grupelor de fungi certifică faptul că aceste fusuri de diviziune ale fungilor sunt similare celor de la eucariotele superioare. Mișcarea cromozomilor spre poli atât în mitoza fungilor și eucariotelor superioare demonstrează similitudini funcționale de bază. Configurația metafazică stabilă este atinsă deoarece forțele de sens opus, aplicate kinetocorilor cu orientare inversă, în timpul prometafazei, sunt balansate adecvat, atunci când un cromozom atinge mijlocul distanței dintre polii fusului.

În tabelul 1 sunt indicați timpii mitozei la o varietate de fungi (după Heath, 1978).

În cazul fungilor, cele mai importante aspecte ale mitozei sunt: structura și comportamentul corpului polar fusorial (centrul organizator de microtubuli) și modul de formare a fusului de diviziune.

Mastigomycotina. Se disting de restul *Eumycotelor* prin prezența centriolilor în apropierea polilor fusului. Ordinul *Chytridiales* are ca reprezentanți principali pe *Entophlyctus* și *Phlyctochytrium*, iar ordinul *Harpochytridiales*, pe *Harpochytrium*. Ambele ordine aparțin *Chytridiomycetelor* și se disting prin deschiderea membranei nucleare în timpul mitozei, o caracteristică corelată cu un corp polar fusorial exclusiv extranuclear. Creșterea fusului este inițiată extranuclear, iar microtubulii apar asociați cu centre organizatoare de microtubuli (corpuri polare fusoriale) localizate lângă centrioli. După ce aceste corpuri polare fusoriale au ocupat poziții la polii opuși ai nucleului, apar goluri în regiunile polare ale membranei nucleare și microtubulii invadează nucleoplasma, spre a forma fusul intranuclear.

În cel de al doilea grup al *Mastigomycotinelor*, sunt incluși: *Allomyces, Catenaria, Blastocladiella, Saprolegnia* și *Thraustotheca*, reprezentanții *Oomycetelor (Saprolegniales)* și *Chytridiomycetelor (Blastocladiales)*. La aceste genuri, corpul polar fusorial este intranuclear și poate fi identificat sub forma unui strat de material electron dens, amorf, cu aspect asemănător membranei nucleare. Adesea, în această regiune, membranele nucleare sunt îngroșate și/sau mai electron dense. Formarea fusului are loc intranuclear, iar cea a microtubulilor extranucleari — în centrele organizatoare de microtubuli din vecinătatea centriolilor.

Tabelul 1. Timpii mitozei la o varietate de fungi (după Heath, 1978).

		Timpul (minute)				
Genul	Bibliografie	Profază	Metafază	Anafază	Telofază	Total
Physarum (am. & plas.)	Koevenig, 1964	15–60	1–5	1–5	2–5	media: 30
Didymium (amoebae)	Kerr, 1967	2	3	1–2	1	7–8
Didymium (plasmodia)	Kerr, 1967	3–5	6–7	1	1	10–12
Perichaena (amoebae)	Ross, 1967	2–3	1–2	< 1	3	7–8
Allomyces	Olson, 1974					5 ?
Mucor	Robinow, 1962				4 ?	100
Basidiobolus	Robinow, 1963					15–20
Strongwellsea	Humber, 1978				30	240
Endogone	Bakerspigel, 1958					4–5
Saccharomyces	Robinow & Marak, 1966					10–15
Schizosaccharomyces	McCully & Robinow, 1971					30 ?
Aspergillus	Robinow & Caten, 1969					6–8
Neurospora	Bakerspigel, 1959					10
Ascobolus	Zickler, 1971	2	1	1	3	6–7
Podospora	Zickler, 1971	2	1	1	3	6–7
Fusarium	Aist & Williams, 1972	1.2	2	0.2	2.1	5.5
Ceratocystis	Aist, 1969					5–10

Timpul (minute)						
Genul	Bibliografie	Profază	Metafază	Anafază	Telofază	Total
Ceratocystis	Aist, 1969					5–10
Rhodosporidium	McCully & Robinow, 1972					< 15
Aessosporon	McCully & Robinow, 1972					< 15
Leucosporidium	McCully & Robinow, 1972					< 15
Ustilago	Poon & Day, 1973	12	5		28	45
Polystictus	Girbardt, 1961		1.8	2	1.3	5–6
Diferite *Homobasidiomycetae*	Thielke, 1973					5–7

Fuller (1976) a sugerat că distincția dintre tipurile mitotice de *Mastigomycotine* poate fi înțeleasă prin numărul și poziția centrelor organizatoare de microtubuli care funcționează în timpul mitozei. Pentru *Blastocladiales* și *Oomycetae*, centrele intranucleare, cât și cele extranucleare organizatoare de microtubuli din timpul mitozei sunt responsabile de elaborarea fusului intranuclear și respectiv de formarea microtubulilor citoplasmatici. Evoluția mitozei la *Chytridiales* și la *Harpochytridiales* a avut loc prin pierderea centrului organizator de microtubuli situat intranuclear, cu transferul concomitent al funcției respective centrului citoplasmatic. Lipsite de centrele intranucleare organizatoare de microtubuli, aceste organisme necesită deschiderea membranei nucleare spre a permite formarea fusului intranuclear, sub direcționarea corpurilor polare fusoriale extranucleare. Fuller (1976) a studiat mitoza la *Rhizidiomyces* și a demonstrat deschiderea membranei nucleare în regiunile polare.

Zygomycotina. Membrana nucleară este complet închisă. *Phycomyces*, *Mucor* și *Pilobolus* aparțin familiei *Mucoraceae*, la care corpurile polare fusale se află sub forma unor knob-uri electron dense, intranucleare și învecinate membranei nucleare. Familia *Basidiobolaceae* prezintă membrana nucleară dispersată, pe când familia *Entomophthoraceae* are o membrana nucleară persistentă în timpul mitozei. Ultrastructura corpurilor polare fusale diferă in cadrul ordinului *Entomophthorales*. La *Ancylistes*, există o masă de material extranuclear electron dens pe membrana externă a anvelopei nucleare, plus un strat mai puțin dens care căptușeste membrana internă a anvelopei. Microscopia electronică a relavat faptul că anvelopa nucleară este continuă între aceste două porțiuni ale corpului polar fusal. La *Basidiobolus* există un corp cilindric în regiunile polare ale nucleilor mitotici.

Ascomycotina. Membrana nucleară rămâne intactă în cursul mitozei, exceptând *Xylaria*. Corpurile polare fusale sunt intim asociate membranei nucleare. Dintre *Hemiascomycete*, toate genurile examinate au aparținut unei singure familii, dar corpurile polare fusoriale sunt foarte diferite. Similar, in clasa *Pyrenomycetes*, toate cele patru genuri analizate au aparținut ordinului *Sphaeriales*. Cu toate acestea, au fost puse în evidență trei tipuri diferite de corpuri polare fusoriale: placă extranucleară (*Xylaria, Xylosphaera*), corp extranuclear în formă de L (*Podospora*) și structură diglobulară extranucleară (*Neurospora)*. Chiar și în cadrul familiei *Sordariaceae*, *Neurospora* și *Podospora* au corpuri polare fusoriale diferite.

Basidiomycotina. Au fost mai puțin studiate, exceptând *Aphyllophorales* și *Agaricales*. În general, corpurile polare fusoriale sunt organite citoplasmatice de formă sferică sau globulară, aflate în vecinătatea membranei nucleare. În interfază, corpul polar fusorial poate avea o conformație diglobulară, pe când în timpul diviziunii nucleare, corpurile polare fusoriale monoglobulare pot fi observate la fiecare pol. Aceste descoperiri sugerează faptul că elementul diglobular este un corp polar fusorial care s-a duplicat în vederea mitozei.

O caracteristică specifică mitozei la *Hymenomycetes* constă în deschiderea anvelopei nucleare în regiunile polare ale fusului, în timpul mitozei. O asemenea dispersie a anvelopei nucleare este o modificare necesară, care permite centrelor organizatoare de microtubuli să funcționeze în construirea fusului intranuclear.

Similar, la unele *Basidiomycete* inferioare, mai precis la *Teliomycetes*, din ordinul *Ustilaianales* (*Ustilago*) și la formele de drojdii (*Aessosporon, Leucosporidium* și *Rhodosporidium*), are loc deschiderea membranei nucleare — proces mai complicat decât simpla fenestrare polară întâlnită la *Hymenomycetele* menționate anterior. Corpul polar fusorial se mișcă adecvat prin aceste deschizături spre nucleoplasmă și permite apoi creșterea microtubulilor între corpurile polare fusoriale.

Analiza mitozei la două *Teliomycete* aparținând ordinului *Uredinales* (*Puccinia* și *Uromyces*), ambele *Basidiomycotine* inferioare, a evidențiat faptul că, în interfază, corpurile polare fusoriale sunt structuri citoplasmatice multipartite, aflate în imediata vecinătate a membranei nucleare. Ele sunt formate din două elemente mai mult sau mai pușin discoidale, conectate de (*Uromyces*), sau așezate pe (*Puccinia*), un strat amorf osmiofil. Pe parcursul mitozei, structura corpului polar fusorial se modifică, astfel că la fiecare pol este prezentă câte o structură discoidală mai simplă. Fiecare din corpurile polare fusoriale mitotice derivă aparent dintr-unul din elementele discoidale ale corpului polar fusorial interfazic. Legătura dintre corpul polar fusorial și membrana nucleară se modifică de asemenea pe parcursul mitozei, astfel încât organitul polar se așează în cadrul planului anvelopei nucleare, adică ocupă o deschizătură de tip por a anvelopei nucleare. Cu toate acestea, discontinuitatea membranei nucleare în regiunile polare este suficientă doar pentru a cuprinde corpul polar fusorial și, prin urmare, ruperea membranei nucleare nu este nicăieri atât de mare și de extinsă așa cum este la *Basidiomycotinele* superioare și la *Ustilaginales.*

Uredinalele se disting de restul *Basidiomycotinelor* prin faptul că au un corp polar fusorial de tip pronunțat placă și gradul de deschidere a membranei nucleare este mai mic. Aceste caracteristici concordă cu faptul că *Uredinalele* sunt primitive printre *Basidiomycotine.* În plus, ele reprezintă criterii importante de studiu a legăturii evolutive dintre *Ascomycotina* și *Basidiomycotina.*

CAPITOLUL XXV

GENOMUL EUCARIOTELOR FOTOSINTETIZANTE INFERIOARE

1. ALGELE VERZI (CHLOROPHYTA)

Acestea sunt organisme care prezintă o organizare tipic eucariotă iar, mecanismele mitotice sunt clasice, cu unele mici variante.

Majoritatea studiilor genetice efectuate la algele verzi s-au referit la *Chlamydomonas reinhardtii,* datorită faptului că posedă 3 sisteme genetice (nuclear, cloroplastic și mitocondrial), ca, de altfel, și celelalte alge, posedă fenomene de reproducere sexuată (izo/anizo-gamie), se menține ușor în laborator și este sensibilă la o multitudine de agenți mutageni. Toate aceste avantaje conferă acestei alge statutul de „model" pentru studii de genetică clasică, biologie moleculară și transformare genetică-inginerie genetică.

Ciclul celular la Chlamydomonas reinhardtii. În condiții de laborator, Kates și Jones (1964) consideră că alga verde *Chlamydomonas* adoptă un ciclu vegetativ sau gametogonic, în funcție de mediul de cultură ales. Pe un mediu TAP (Tris Acetate Phosphate) (Gorman si Levine ,1965,1969 ; Hutner si colab.,1950) alga urmează un ciclu vegetativ, iar pe un mediu sărac în azot (Sears si colab.,1980) se declanșază procesul de producere a gameților. Prin alternanța de medii de cultură se pot realiza în laborator încrucișari și sincronizari la tulpiniile de *Chlamydomonas*. În condiții naturale, ciclul celular complet decurge conform schemei din Fig.1A.

Mitoza la Chlamydomonas. Nucleul este tipic eucariot, cu membrana dublă, cromatina organizată în cromozomi, nucleolul este mare , cu structuri fibrilar-granulare, uneori asociat cu un cromozom organizator nucleolar

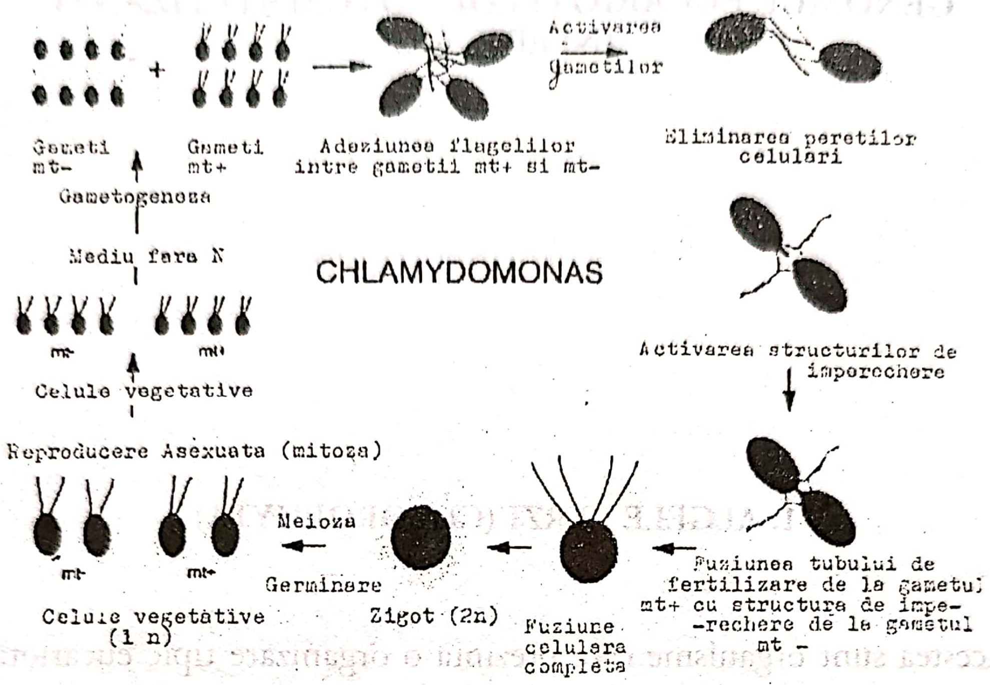

Activarea
gametilor
Gameti
mt-
Gameti
mt+
Adeziunea flagelilor
intre gametii mt+ si mt-
Eliminarea peretilor
celulari
Gametogeneza
Mediu fara N
CHLAMYDOMONAS
mt-
mt+
Celule vegetative
Activarea structurilor de
imperechere
Reproducere Asexuata (mitoza)
Meioza
mt-
mt+
Germinare
Celule vegetative
(1 n)
Zigot (2n)
Fuziune
celulara
completa
Fuziunea tubului de
fertilizare de la gametul
mt+ cu structura de impe-
-rechere de la gametul
mt -

Fig. 1A — Ciclul celular la *Chlamydomonas reinhardtii*.

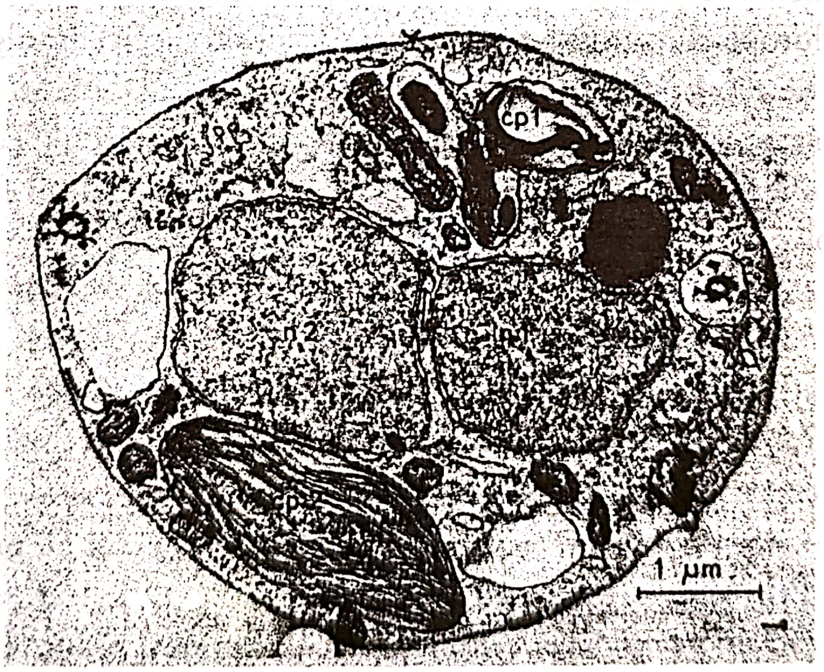
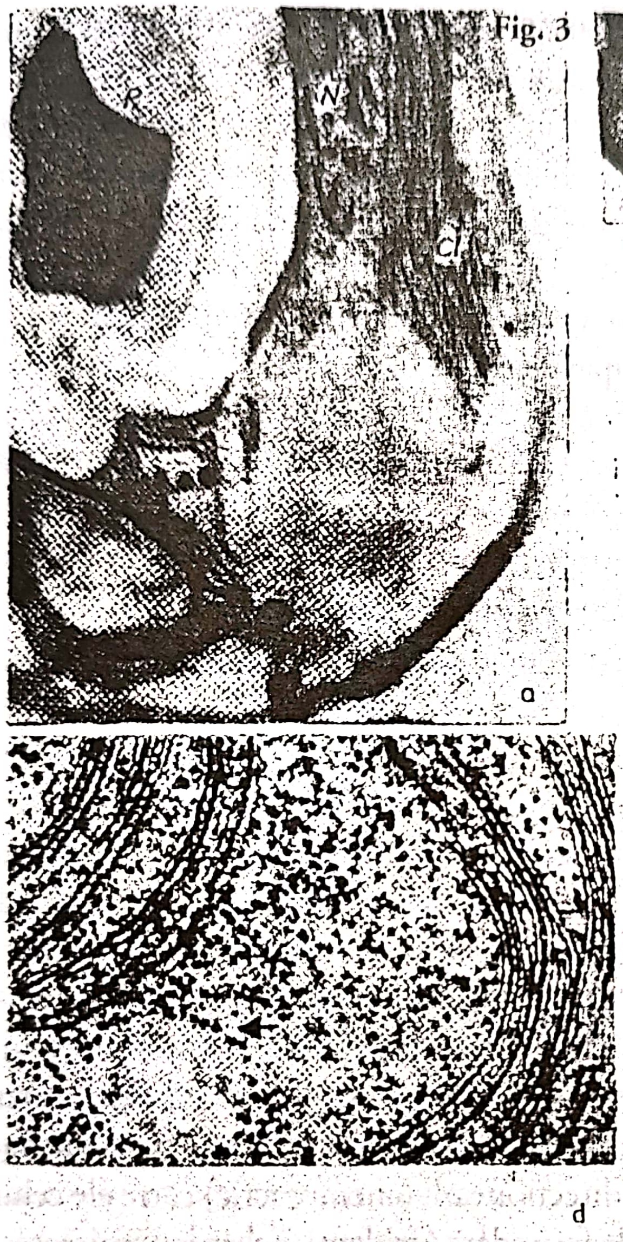
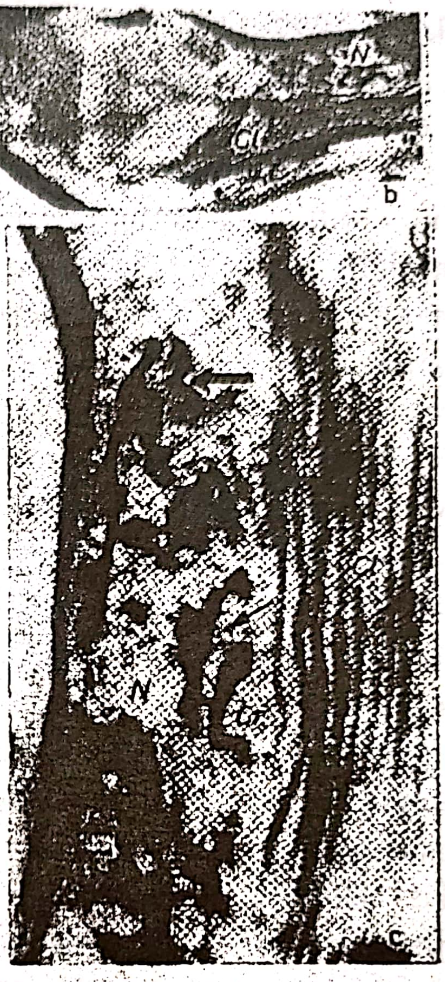


Fig. 1B — Electronofotografia zigotului de *Chlamydomonas reinhardtii*, la 60 minute de la fuzionarea celulelor sexuale. Se poate vedea că într-o singură celulă (zigotul 2n) se află încă doi cloroplaști (cp 1 și cp 2) iar cei doi nuclei se află chiar la începutul procesului de fuzionare (după Blank și colab., 1978).





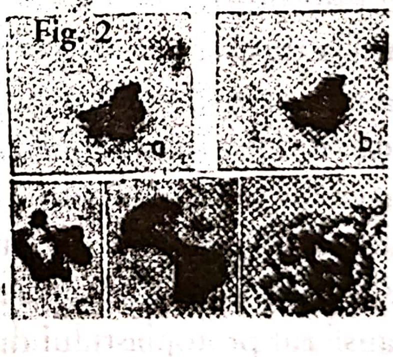


Fig. 2 — Cromozomii de *Chlamydomonas reinhardtii* la microscopul optic, a, b, în Metafaza (n=8); c, în Anafaza; d, cariogamia în procesul de fecundare; e, sinapsa cromozomală în diviziunea meiotică desfăşurată la germinarea zigosporului (după Gavrilă, 1978).

Fig. 3 — Ultrastructura nucleului zigotului în germinare, la *Chlamydomonas reinhardtii*. Se remarcă existența unor asocieri latură pe latură (săgeata simplă) sau cap-la-cap (săgeata dublă) între cromozomii omologi (după Gavrilă şi Tacina, 1977; a, X25000; b, X18000; c, X77000) d. O porțiune din cloroplastul de *Chlamydomonas reinhardtii* în care se remarcă electronomicroscopic fibrilele de ADNcp – săgeata (din Goodenough şi Levine, 1977).

(Howel 1972; Gavrila si colab.,1977). Nucleul este de obicei înconjurat de ribozomi, cromozomii fiind atașati de membrana nucleară.

Diviziunea nucleului (Howel, 1972) este urmată de diviziunea centrozomului. În vederea diviziunii, nucleul suferă o deplasare spre periferia celulei, în Profază, nucleul având un volum dublu, față de nucleii-fii rezultați din diviziune. Cromozomii capătă aspect granular sau de baghetă (Fig2). Evenimentele din Profază se pot rezuma astfel: -dispariția nucleolului, apariția fusului de diviziune, apariția la fiecare pol al fusului nuclear a fereastrei spre care sunt orientați microtubulii fusului.Citoplasma adiacentă ferestrelor nu conține ribozomi. Adiacent nucleului a fost evidențiată o invaginare caracteristică ce se arcuiește asupra nucleului în diviziune.

În mitoza acestei alge se organizează placa ecuatorială.

În Metafaza-Anafază, placa ecuatorială devine compactă, în formă de disc, și se clivează după diametrul mare, în două placi anafazice (Shaecter si colab., 1955).

În Telofază, după finalizarea separării nucleilor fii, aceștia se mențin apropiați, spațiul dintre ei fiind ocupat de reticul endoplasmatic (RE).

Fecundarea la Chlamydomonas. Ciclul de viață la *Chlamydomonas* include o fază haploidă (n), formă sub care există în cea mai mare parte a ciclului, prin unirea celulelor sexuale purtătoare de gene mt+ sau mt- (♀ și, respectiv, ♂) prin procese de izogamie sau anizogamie (oogamie) rezultă celula-ou sau zigotul care este diploid (2n). În formarea zigotului fuzionează mai întâi, citoplasma apoi nucleul și în cele din urmă cloroplastul celulelor sexuale (vezi fig.1B). Purtătorii de gene mt+ au abilitatea de a sintetiza substanțe atractante (feromoni) prin care direcționează (chemotactic) către ele celulele mt-. Celulele mt+ emit un tub de fecundare (evidențiat electronomicroscopic de către Friedman și colaboratorii în anul 1968) prin care se realizează transferul protoplastului din celula mt- în celula mt +.

Uneori, în cazul algei *Chlamydomonas moewussi*, transferul protoplastului este mediat de existența unei apropieri între celule mt+ și mt-, prin intermediul unei teci flagelare (Brown și colab., 1968).

Indiferent de sistemul ce mijlocește apropierea celor două celule sexuale, are loc transferul protoplastului (și deci a cromatoforului și a mitocondriilor) asigurând și recombinarea genelor cu segregare non-mendeliană (formare de cloroplast/cromatofor zigotic) (Lavalier și colab., 1970). Fuziunea nucleară (cariogamia) are loc în 24 ore, la lumină, și în 6 zile, la întuneric.

Meioza la Chlamydomonas este tipică (Levine și colab., 1959) și durează 4 ore, în urma ei rezultând 4 celule vegetative haploide și are loc la germinarea zigosporului uninucleat, diploid. În zigospor are loc o singură rundă de replicare a ADN, la cca. 6-8 ore după germinare. Fiecare gamet conține 2 complemente haploide de ADN, astfel zigotul este de fapt 4n (Kates și colab., 1968). Replicarea ADN conduce la apariția unui nivel de ploidie 8C, datorită unei replicări postsinaptice (Sueoka și colab, 1967).

Perioada considerată sensibilă pentru recombinare este de 5.5-7 ore, după germinarea zigosporului.

În cursul meiozei la *Chlamydomonas globulosa*,Gavrila și colab. (1977) au pus în evidență fenomenele de sinapsă cromozomală ce permit cromozomilor să se asocieze latură–pe–latură sau cap–la–cap (Fig.3). Ebersold (1963), a constatat că la *Chlamydomonas reinhardtii* unii zigoți se divid mitotic și formează sușe diploide, cu fenotip mascul (mt-). Gameții la *Chlamydomonas* pot vira spre creșterea vegetativă, în orice moment, până la fuzionare (fecundare). Unele specii de *Chlamydomonas,* dar și specii înrudite, rămân mobile în timpul diviziunii; majoritatea speciilor însă își pierd flagelii ca pregătire pentru diviziune. Clivajul celular este longitudinal, începând cu zona corpilor bazali.

În celulele vegetative, corpii bazali rămân atașați la membrana plasmatică, prin fibre tranzitorii și nu acționează ca centrioli, în timpul diviziunii la *Ch. reinhardtii*, comparativ cu *Chlamydomonas moewussi*. La aceasta din urmă, corpii bazali migrează spre nucleu și se asociază cu membrana nucleară, replicându-se apoi în pre-Profaza . Ulterior, în Profaza, perechile de corpi bazali migrează spre polii nucleari.

La *Ch. reinhardtii,* protoplastul se rotește în timpul diviziunii și tot acum pirenoidul se alungește și se divide împreună cu cloroplastul (cromatoforul). În stadii tardive ale diviziunii, stigma (organitul sensibil la lumina) trece la unul din cromatoforii fii, iar în cealaltă celulă, aceasta se formează *de novo*.

Cromozomi: formă - dimensiuni - cariotip /variația numărului de cromozomi. Literatura oferă date variate asupra numărului de grupe de linkage ce se întâlnesc la *Ch. reinhardtii*: 17 (Rochaix, 1995) sau 19 unități de linkage, această variație fiind explicabilă prin folosirea unor metode de PFGE (Electroforeză în Câmp Pulsator sau *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) din ce în ce mai performante. O parte dintre genele de importanță majoră în viața acestei alge au fost deja localizate în cromozomi.

Lungimea cromozomilor diferă. Astfel, la *Ch. reinhardtii*, aceasta este cuprinsă între 0.2-0.6µm, iar la *Chlamydomonas eugametos* este de 0.2-0.8µm (Abbas și colab.,1965).

Alga *Chlamydomonas* este în stare vegetativă haploidă (Dangerard, 1899). Prin determinarea numărului de cromozomi în celulele vegetative, la mai multe specii ale genului, s-a constatat o variație a numărului de cromozomi prin endomitoze și poliploidie.

La *Ch. reinhardtii* s-a descris o mutantă la care apare o asincronie între cariodiereza și diereza organitelor, rezultând o endomitoză avansată, soldată în final cu apariția de celule polienergide (Darber și colab.,1971).

2. ADN LA *CONJUGATA*

Spirogyra sp. posedă cca 5,8x10 ^{9} Da./cel./set n. La nivelul NOR se află fracția specifică de ADN implicată în sinteza structurilor nucleolare, respectiv ARNr. Donell (1965), a observat că ADN din cromatina perinucleară pătrunde în nucleolul de *Spirogyra* (Busch și Smetana, 1970).

3. ADN LA *CHRYSOPHYTA*

La diatomee, conținutul C+G% este în general mai mic decât 50%, variind între 37 și 58%. Analiza efectuată de Sober (1970), la 11 specii de diatomee, a evidențiat că această trăsătura le apropie mai mult de plantele superioare, decât de alge, la care conținutul C+G% poate să depășească 50% din ADN-ul total. În compoziția ADN-ului total de la *Navicula pelliculosa* și *Nitzschia palea* s-a constatat un raport A/T, G/C și Purine/Pirimidine de : 1.01; 1.06; 1.03 respectiv 1,09; 0,99; 1,04.

Studiind conținutul de ADN/celulă la 10 alge unicelulare, Holm-Hansen (1969) constată că cele mai mici celule, aparținând speciei *Navicula pelliculosa*, au un conținut de cca. 10pg C organic și de 0.1pg ADN, situație asemănătoare cu aceea întâlnită la *Monochrysis lutheri*, dintre crisoficee *Skeletonema costatum* și *Thalassiosira fluviatilis* conțin până la 10pg ADN/celula.

Prezența ADNcp, la *Xantophyceae* a fost demonstrată de Miyamura și Hori (1991) la *Pseudodichotomosiphon constrictus*, sub forma unui nucleoid, în pirenoid, aceasta poziționare confirmând rezultate mai vechi (la diatomeea *Streptotheca thamesis* -Esser, 1967) de localizare a ADNcp la acest nivel. ADNcp al algei galbene *Vaucheria bursata* a fost estimat la 124,6Kb. și el corespunde unei molecule circulare ce a fost cartată cu enzime de restricție și s-au localizat genele ce alcătuiesc zonele IR *(Inverted Repeats)* (von Berg si Kowallik, 1992).

4. ADN LA *PHAEOPHYTA*

ADN-ul feoplastelor (ADNcp) a fost evidențiat încă din anul 1970 (Bisalputra și colab.) la *Sphacellaria sp* și se prezintă sub 4 configurații diferite (între 5-10µm). Datele obținute au demonstrat că ADNcp este circular și s-a determinat harta de restricție și poziția câtorva gene cloroplastice la *Laminaria* (Kuhsel și colab., 1987).

5. ADNmt DIN FEOFITA *PYLAIELLA LITTORALIS*

ADNmt din feofita *Pylaiella littoralis* ce codifică subunitatea mare (Large SubUnity-LSU) a ARNr a fost secvențiat și s-a determinat astfel arhitectura genelor și harta de restricție a acestui fragment. Totodată s-a analizat și structura secundară a ARNr LSU și s-a comparat cu structuriile secundare ale ARNr de la *Chondrus crispus* (*Rhodophyta*); *Prototheca wickerhamii*(*Chlorophyta)* si o proteobacterie, constatându-se absența anselor H, iar în zona hiperconservată posedă numai 2nucleotide. (Fontaine si colab.,1995)

6. ADN- LA *RHODOPHYTA*

La rodoficee, conținutul de baze C+G este de 42%, la *Griffithisia globulifera*, iar la *Porphyra tenera* se evidențiază pe lângă banda principala a ADN nuclear și o bandă de ADNsatelitic -nuclear. O caracteristică a algelor roșii este că faza G2 a ciclului celular este mult mai lungă, față de alte organisme eucariote. Astfel, la 15 genuri aparținând *Gigartinalelor*, Goff și Coleman (1984, 1987) au constatat că dacă conținutul de ADN nuclear se dublează între G1 și G2, în G2 celula haploidă a acestor alge va conține aceiași cantitate de ADN ca o celulă normală în G1.

ADN-ul rodoplastelor (ADNcp) a fost evidențiat sub forma unor fibre de ADN, de 4-10nm lățime, la *Porphyra tenera, Polysiphonia urceolata, Salieria mollis* , *Laurencia spectabilis.* Ulterior ADNcp, de la *Codium fragile,* a fost izolat, fiind estimat a avea 89Kb (Manhart și colab., 1989) iar la *Chondrus crispus* s-a estimat a avea 137Kb (Leblanc și colab., 1995).

Comparația dintre ADNcp provenit de la genurile de alge roșii *Gracilaria* și *Gracilariopsis* a arătat prezența unor molecule de ADN mai mici, mai greu digerate de enzimele de restricție (Goff și Coleman, 1988). Studiile de microscopie electronică au arătat că acest ADN este reprezentat de molecule mici, circulare și dublu catenare, considerate plasmide. Villemur (1990) a descris plasmide și la alte genuri de rodoficee. Moon și Goff (1997) descriu la *Porphyra pulchra* 5 plasmide dintre care două plasmide mari (6859pb, 6427 pb) a căror secvențe nu prezentau omologie și trei plasmide mai mici (1896pb, 2100pb, 2102pb.), cu diferite grade de omologie una față de cealaltă. Aceste plasmide sunt circulare, alcătuite din ADN dublu-catenar și sunt prezente într-un număr însemnat de copii în celulele acestor alge. Studiul secvențelor acestor plasmide a relevat existența de cadre deschise de citire (ORF), fapt ce sugerează implicarea informației genetice conținute în acestea în sinteza unor proteine. Experimental, s-a dovedit că prezența acestor plasmide nu afectează transmiterea unor caractere ereditare cu localizare în genomul nuclear, plastidial și mitocondrial. Această însușire, precum și numărul mare de copii în care se află în celulă, fac din aceste plasmide candidate pentru obținerea de vectori pentru introducerea de gene utile în algele roșii (Goff și Coleman , 1990).

ADNmt a fost identificat sub forma unor fibre de ADN de 25µm sau sub forma unor baghete groase, rezultate prin asocierea fibrelor elementare de 25µm, așa cum se întâlnesc în mitocondriile algelor roșii *Porphyra tenera* și *Polysiphonia urceolata.*

CAPITOLUL XXVI

CLUSTERI DE GENE ÎN GENOMUL ALGELOR

1. CLUSTERI DE GENE NUCLEARE

1.1 LOCUSUL DE ÎMPERECHERE (mt : MATING TYPE LOCUS) LA *CH.REINHARDTII*

Locusul de împerechere *mt* este situat pe brațul stâng al cromozomului VI și este reprezentat de o pereche simplă de alele *mt* + și *mt*-. Aceasta posedă funcții complexe, legate de fenomenele de cuplare a gameților, sporulare, desfășurare a meiozei și de transmiterea genomului organitelor în descendență (Harris, 1989). Printre genele ce sunt strict legate de locusul *mt* există și câteva ce nu au legatură cu împerecherea, sugerând faptul că în acest locus se exercită o supresie recombinațională (Gilham, 1969). Locusul *mt* a fost recent clonat, folosindu-se tehnica „*Chromosome walking*", sub forma unui fragment de 1.1Mb. (Ferris și Goodenough, 1994). S-a constatat că cel putin în 830Kb din acest fragment au loc frecvente recombinări și această zonă poate fi divizată, la rândul ei, în 3 domenii.

Comparația între locii *mt*+ și *mt*- a arătat că domeniul central, de 190 Kb, include 4 translocații intracromozomale, 2 inversii și deleții și duplicații de mari dimensiuni. Hărțile locilor *mt*+ și *mt*- nu sunt întotdeauna coliniare, în acest domeniu central, ci prezintă regiuni specifice, unice fiecărui locus în parte. Aceste regiuni conțin gene codificatoare pentru funcții legate de împerechere. Domeniul central este inconjurat de domeniu proximal al centromerului, de 525Kb, și de domeniul proximal al telomerului, de

110Kb. Aceste domenii învecinate sunt colineare cu cel central pentru ambii loci (*mt+* și *mt-*), dar nu sunt în mod necesar identice. Natura dimorfică a locusului *mt*, la *Ch. reinhardtii*, ce afecteaza 3-4% din cromozom, arată că acest locus este situat evolutiv pe la mijloc, între locusul MAT al drojdiilor și fungilor și heterozomii organismelor evoluate (inclusiv unele alge). Din această cauză, se consideră că locusul *mt* de la *Ch. reinhardtii* are proprietățile unui cromozom de sex, în stare incipientă (Ferris și Goodenough, 1994).

1.2 GRUPUL NUCLEAR DE LINKAGE „*UNI*", LA *CH. REINHARDTII*

Un grup de linkage numit „*uni*" a atras atenția în mod special. Numele său derivă de la mutația *uni* ce afectează asamblarea unui singur corp bazal și are ca urmare apariția de celule *uni*flagelate, deosebindu-se astfel de tulpina sălbatică care este biflagelată. Acesta s-a dovedit a fi un cromozom linear de 6-9Mb. (Hall și colab., 1989). Trăsătura neobișnuită pentru grupul de linkage *uni* este aceea că el include câteva mutații ce afectează funcționarea și asamblarea aparatului flagelar. Un asemenea mod de grupare a unor gene funcționale înrudite nu se întâlnște la cromozomii altor eucariote.

2. CLUSTERUL PLASTIDIAL DE GENE ery-1 DE LA *CH.REINHARDTII*

În timpul încrucișării, la scurt timp după formarea zigotului,dar probabil înaintea fuziunii celor 2 cloroplaste, ADNcp de la individul mt- este degradat și, în cele mai multe cazuri, numai ADN-ul individului mt+ este transmis în descendență. Însă, în cazuri rare, apar și zigoti biparentali, în care zestrea genetică plastidială a ambilor parteneri mt+ și mt- este transmisă în descendență. În prezent, se cunosc relativ puține date despre mecanismele moleculare ce guvernează această transmitere uniparentală. S- a presupus că ADNcp provenit de la individul mt+ este protejat selectiv față de degradare, prin modificare. Degradarea selectiva are loc numai în zigoții adevărați, nu însă și în diploizii vegetativi. Această degradare poate fi prevenită prin tratarea zigotilor cu inhibitori de transcriere sau translație eucariotici, demonstrându-se astfel că produșii nucleari zigotici sunt absolut necesari (Kuroiwa ,1985). Recent, s-a descoperit un cluster de gene specifice zigotului și denumit *ery-1,* ce se învecinează cu locusul *mt.* Acest cluster este transcris aproape imediat, după ce s-a format zigotul (Armbrust și colab., 1993). Polipeptidele codificate de *ery-1* sunt importate, atât în cloroplastele provenite de la indivizii mt+, cât și la cele de la indivizi mt-, unde interacționeaza cu nucleoizii acestor plastide, distrugând preferențial nucleoidul mt-.

3. CLUSTERI DE GENE PLASTIDIALE

3.1. ZONE *IR*

Analizele profilelor de restricție ale ADNcp au condus la descoperirea în genomul plastidelor a unor secvente invers repetate (***Inverted Repeats: IR***) ce ulterior au fost confirmate prin vizualizarea duplexurilor, la microscopul electronic.

Aceste zone IR adăpostesc genele pentru ARN r, gene pentru ARNt precum și gene structurale, implicate în fotosinteza (*psbA*) sau în sinteza ATP-azei (*atpB*). (Fig. 1)

La majoritatea plantelor superioare și la cloroficee (*Ch. reinhardtii*) aceste secvențe prezintă dimensiuni cuprinse între 20-24Kb, în ADNcp, din plastidele verzi, si 28.5-28Kb, în ADNcp, din cromoplaste. Aceste secvențe invers repetate sunt separate printr-o regiune mică (**S**ecvență **U**nică **M**ică sau **SSC**) și o regiune mare (**S**ecvență **U**nică **M**are sau **LSC**).

Lungimea secvențelor unice între IR, variază considerabil. Astfel: la *Zea mays,* regiunea SSC este de 12Kb, comparativ cu aceea de la *C. reinhardtii* care are 76Kb. LSC are la *Zea,* 22.5Kb, iar la *Chlamydomonas,* 21Kpb, excepție facând de la acest tip de organizare ADNcl de la *Phaseolus aureus, Pisum sativum, Euglena gracilli.* În cazul *E. gracillis* au fost descrise tulpini denumite Z-S, la care ADNcp nu conține IR, și tulpini denumite Z-Hal, la care ADNcp conține o secvență IR repetată în tandem de trei ori, având o lungime de 5.6-5.8Kb. La *E. gracillis,* Wurtz și Buetow (1981) au demonstrat existența unui singur IR de 5.6Kb.

Cercetările efectuate de Lemieux și Trumel (1987) asupra hărților de restricție la *Chlamydomonas moewusii* și *Chlamydomonas eugametos* au arătat

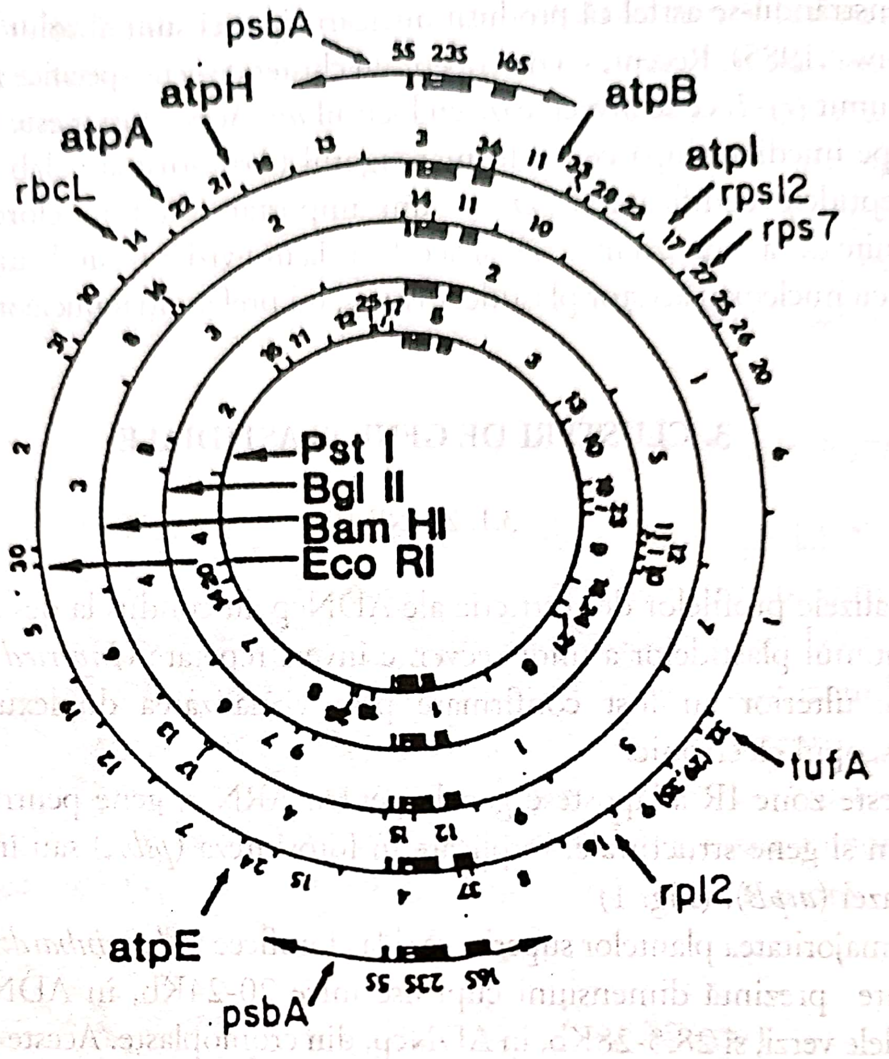

psbA
5S 23S 16S
atpH
atpB
atpA
atpI
rbcL
rps12
rps7
Pst I
Bgl II
Bam HI
Eco RI
tufA
rpl2
atpE
5S 23S 16S
psbA

Fig. 1 — Harta fizică și de restricție pentru ADNcp la *Chlamydomonas reinhardtii* (după Harris, 1989). Cu arcuri de cerc sunt marcate regiunile IR ce conțin genele ribozomale 5S, 23S și 16S, câteva gene pentru ARNt și gena structurală *psbA*.

că la ambele organisme există o singură IR și aceasta conține genele *psbA* și *rbcL,* comparativ cu IR de la *Ch. reinhardtii,* la care IR conține numai gena *psbA*, iar gena *rbcL* se află la o distanta de cca.15Kb față de IR.

La alga galbenă *Vaucheria bursata* s-a pus în evidență o zonă IR de 5.85Kb, ce este izolată de o LSC de 64.6Kb și de o SSC de 48.3Kb. (von Berg și Kowallik, 1992).

La ADNcp din feofita *Dyctiota dichotoma*, Kuhsel și Kowallik (1987) pun în evidența o singură IR de aproximativ 4.7Kb, ce este izolată de o LSC, de 72Kb și o SSC, de 42Kb.

La ADNcp din rodofita *Chondrus crispus*, din totalul de 137Kb, cât însumează ADNcp, genele pentru ARNr 16-23S se află organizate într-un singur IR, de aproximativ 1.5Kb.(Leblanc și colab., 1995)

În afara zonelor IR, devenite acum clasice la *Ch reinhardtii,* precum și la *E. gracillis* Z. Gelvin și Howell (1979) au găsit fragmente de 0.1-0.3Kb, localizate neuniform în genomul cloroplastic. Rochaix și colab. (1978-1981) au evidențiat regiuni de 1.5Kb în structura internă a IR ce ulterior au fost găsite și în gena pentru ARNr 5S, iar Koller și Delius (1982) au cartat două fragmente repetitive de 0.125Kb în IR, din ADNcp de la *E. gracillis.*

CAPITOLUL XXVII

ARHITECTURA GENELOR LA ALGE ȘI CITOGENETICA GRUPELOR SUPERIOARE DE ALGE

1. PARTICULARITĂȚI ALE GENELOR NUCLEARE LA *CHLAMYDOMONAS REINHARDTII*

Cele mai multe date acumulate până în prezent se referă la *Ch.reinhardtii* la care complexitatea genomică a fost estimată la 7-10 x 10^5 Kb. (Harris 1989) și s-au identificat 148 de loci genici.

Utilizarea codonilor la *Ch. reinhardtii* a putut fi bine observată, odată cu secvențierea majorității genelor cu exprimare puternică: genele pentru fotosinteză, cele ale aparatului flagelar și *hsp* (*heat shock proteins*-proteine de șoc termic). Resturile de C și G, în cea de a treia poziție a codonilor sunt preferate altor nucleotide, același fenomen se observă și pentru prima pozitie a codonului. Rezultă de aici o creștere semnificativă a conținutului CG, în ADN-ul nuclear. O compoziție mai echilibrată în baze AT cât și CG se întâlneste la genele nucleare, ce sunt exprimate mai puțin, așa cum este gena pentru citocromul c_6 (Hill și colab., 1991) și arilsulfataza (deHostos și colab., 1989). Regiuni genice bogate în A sunt reprezentate de cutia TATA, aflată înaintea genelor structurale, ce este imediat urmată de o zona bogată în CG.

Un motiv de recunoaștere pentru poliadenilare este TGTAA ce se regăsește în toate cazurile la capătul 3', respectiv la 10-15 nucleotide în amonte de situsul de poliadenilare.

O altă caracteristică a genelor nucleare, la *Ch.reinhardti*, este prezența a mai multor introni, în contradicție cu plantele la care de obicei se întâlnește câte un singur intron (Muller și colab., 1992). De pildă, gena *hsp70* (pentru proteina de șoc termic) conține 6 introni iar *rbcS2* (pentru unitatea mică a RUBISCO), 3 introni (Goldschmidt-Clermont și Rahire, 1986). Rolul acestor introni a putut fi pus în evidență de experimente realizate de Lumberas și colab. (1998). Aceștia au arătat că intronul I din structura genei *rbcS2* pare să conțină o secvență (*enhancer*) ce crește considerabil exprimarea unor gene străine sau himerice în *Ch.reinhardtii.*

2. CARACTERISTICI ALE GENELOR DIN GENOMUL PLASTIDIAL LA *CH.REINHARDTII*

Genomul plastidial la *Ch. reinhardtii* este aproximat de 196Kb (Fig. 1) și, până în prezent, sunt bine cunoscute secvențele a 80 de gene (Boundreau și colab., 1994). Genele plastidiale sunt bogate în baze AT și din această cauză ADNcp este mai puțin dens decât cel nuclear. Diferența între utilizarea codonilor în genele plastidiale comparativ cu cele nucleare sugerează originea procariotă a acestor gene (în concordanță cu teoria simbiotică). Din totalul de 80 de gene, 26 codifică subunități ale complexelor fotosintetice, 18 sunt pentru ARNt, 14 sunt pentru proteine ribozomale, 5 gene pentru ARNr, 3 gene pentru subunitățile ARN polimerazei, câteva ORF-uri cu funcție neclară, 3 gene implicate în sinteza clorofilei, independentă de prezența luminii și 1 genă (*clp*) ce codifică o protează dependentă de ATP. Câteva gene însă sunt unice pentru genul *Chlamydomonas* și nu au fost decelate în genomurile plastidiale ale altor alge și plante superioare (Boundreau și colab., 1994). Alte gene pentru proteine plastidiale cum sunt *rps3*, *rpoC2a* și *clpP* sunt clar mai mari decât omoloagele lor, de la plantele superioare și conțin secvențe lungi, adiționale,cu funcție necunoscută ce sunt juxtapuse cu regiuni codificatoare în cadru. Semnificația acestor proteine mari himerice este incertă și se poate datora și unui fenomen de *splicing* la nivel proteinic (Huang si colab., 1994).

3. CARACTERISTICI ALE GENELOR MITOCONDRIALE LA *CH.REINHARDTII*

Genomul mitocondrial la *Ch. reinhardtii* a fost aproximat la 15.8 Kb, prezentând două capete cu secvențe inversate ce amintesc de cele întâlnite la genomul plastidial (Harris, 1989). În urma secvențierii, s-a constatat prezența a 8 gene structurale, 3 gene pentru ARNt și 2 gene pentru ARNr. (Fig.1)

Proteinele sunt reprezentate de citocromul b, subunitatea 1 a citocrom-oxidazei (CO I), 5 subunități ale NADH-dehidrogenaza și o proteină de tip reverstranscriptază cu funcție necunoscută. Surprinzător, la *Chlamydomonas reinhardtii,* genele pentru subunitățile II și III ale citocromoxidazei și pentru toate subunitățile ATP-sintetazei nu sunt codificate în genomul mitocondrial. Găsirea a numai 3 tipuri de gene pentru 3 tipuri de ARNt sugerează în mod clar că celelalte tipuri de ARNt sunt codificate de gene nucleare și sunt importate în mitocondrii (același lucru fiind demonstrat și pentru ARNt de la plantele superioare) (Marechal-Drouard și colab., 1988).

Cea mai inedită trăsătură a ADNmt la *Ch.reinhardtii* o constituie genele pentru ARNr ce sunt fragmentate în câteva module codificatoare mici, dispersate pe mai mult de 1/2 din genomul mitocondrial și intercalate cu genele pentru ARNt (Boer și colab., 1985). Produșii de transcriere ai acestor gene modulare pentru ARNr se acumulează sub forma de ARNs (subribozomal) cu greutăți moleculare mici, care apoi, pe baza omologiei nucleotidelor terminale, se asamblează și formează structurile secundare pentru ARN-ul SSU și respectiv LSU.

4. ARHITECTURA GENEI NUCLEARE *arg7*, DE LA *CHLAMYDOMONAS*

Gena *arg7* codifică arginosuccinatliaza (ASL), produsul genei fiind un homotetramer compus din unități de 50Kd. cu o lungime de 471 aminoacizi, având o omologie de secvență de aminoacizi de 51-54% cu ASL, din celulele de mamifere, drojdii și procariote. Mutația acestei gene necesită adăugarea argininei în mediul de cultură al algei. Gena are localizare nucleară, pe cromozomul I și, prin studiile întreprinse de Debuchy și colab. (1989) a devenit cea mai folosită genă marker pentru monitorizarea transformării nucleare și obținere de mutații direcționate la *Ch reinhardtii* (Adam și colab., 1993; Davies și colab., 1994). Gena mai este folosită ca marker și la co-transformarea algei cu ADN străin și pentru a studia fenomenele

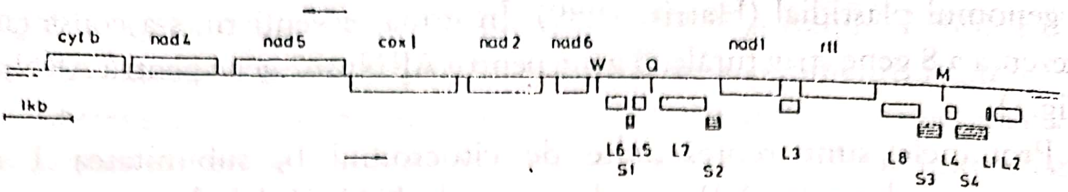

cyt b
nad 4
nad 5
cox I
nad 2
nad 6
nad 1
rtl
W
Q
M
1kb
L6 L5
S1
L7
S2
L3
L8
S3
L4
S4
L1 L2

Fig. 1 — Harta funcțională a genomului mitocondrial la *Chlamydomonas reinhardtii* (15,8Kb). Liniile duble de la capete arată localizarea secvențelor repetate invers. Gena *rtl* (Boer și Gray, 1988) codifică o proteină de tip revers-transcriptaza. Literele W (Triptofan), Q (Ac. glutamic), M (Metionină) arată localizarea genelor pentru speciile de ARNt corespunzătoare. Prin L și S sunt marcate regiuni ale genelor LSU și respectiv SSU, pentru ARNr. Direcțiile în care se realizează transcrierea sunt marcate cu săgeți (după Michaelis, Vanderholtz și Pratje, 1990).

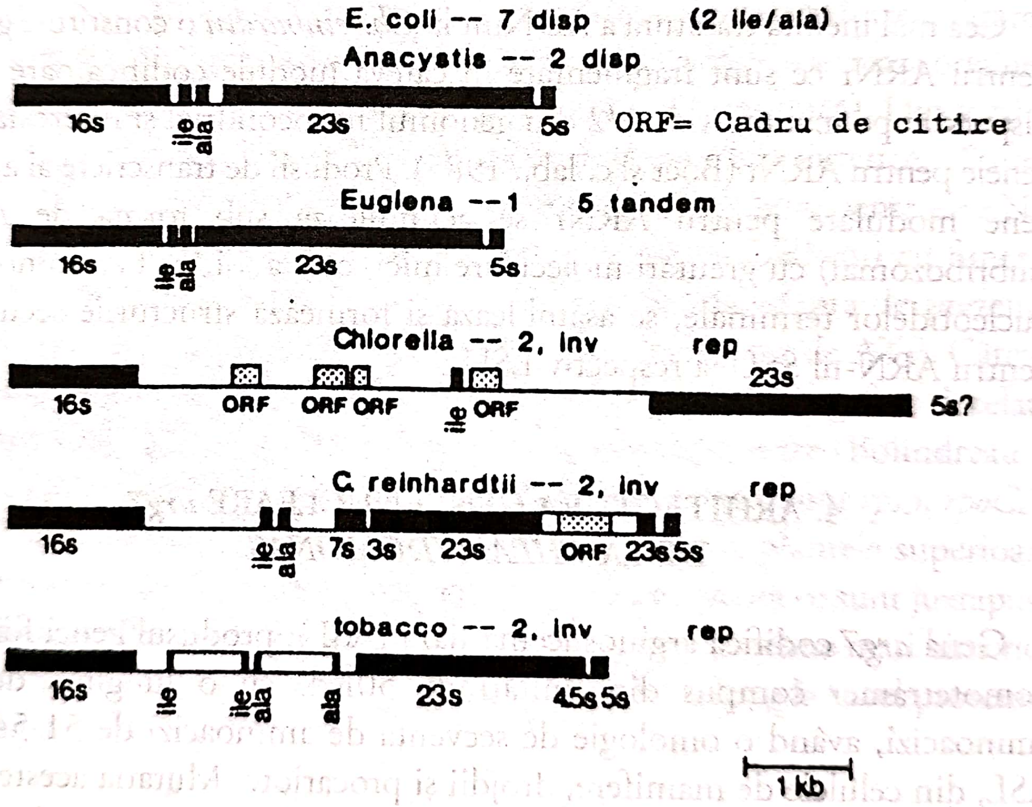

E. coli -- 7 disp (2 ile/ala)
Anacystis -- 2 disp
16s
ile
ala
23s
5s
ORF= Cadru de citire
Euglena --1 5 tandem
16s
ile
ala
23s
5s
Chlorella -- 2, inv rep
16s
ORF
ORF ORF
ile
ORF
23s
5s?
C. reinhardtii -- 2, inv rep
16s
ile
ala
7s 3s
23s
ORF
23s 5s
tobacco -- 2, inv rep
16s
ile
ile
ala
ala
23s
4.5s 5s
1 kb

Fig. 2 — Aranjamentul în operoni al genelor pentru ARNr și prezența intercalată a unor gene pentru ARNt, din cromozomi și ADNcp, la mai multe organisme: bacteria *E.coli* (ADN cromozomal), cianobacteria *Anacystis* (ADN cromozomal), microorganismul fotosintetizator *Euglena* și algele *Chlorella* și *Chlamydomonas reinhardtii*, precum și planta superioară (tutun). Disp – operon dispersat în genom. Inv. și Rep. – cei doi operoni pentru ARNr sunt dispuși invers în cadrul aceluiași ADNcp (după Harris, 1989).

rare de recombinare ce se produc odată cu integrarea ADN străin în genomul clorofitei (Gumpel și colab., 1994). Construirea unei cosmide (prin cuplarea genei *arg7* ca fragment *MboI* din *Ch.reinhardtii cw15*, în vectorul pARR7,8cos, a permis secvențierea totală a acestei gene. Conținutul de C+G eate de 67.7%, din gena *arg7*, față de 64.3%, cât se întâlnește în restul genomului la *Ch.reinhardtii*. Gena *arg7* este reprezentată de o regiune de 7.7Kb, corespunzatoare situsului descris de Matagne (1978). Studiile întreprinse asupra codului genetic au arătat că în cazul genei *arg7* nu există diferențe majore față de restul genomului nuclear, unde se conturează tendința ca cea dea treia nucleotidă a codonului să fie C/G (Rochaix, 1978).

Studiul genei *arg 7* a mai relevat prezența a 12 introni (197-580pb) ce întrerup regiunea codificatoare. Analiza comparativă a zonelor de joncțiune intron/exon, de la mai multe specii, a demonstrat că zonele de splicing din gena *arg7* sunt diferite. Diferența rezidă în secvențe G/G*C*GAG unde baza subliniată poate fi T sau C, fenomen întâlnit și la alte specii (Padgett și colab., 1986). Gena *arg7* cuprinde în structura intronilor și câteva secvențe înalt repetitive. Așa este secvența (GGGT)n, ce se repetă pe intervalul 2563-2640 de aprox 15 ori. Alte secvențe sunt reprezentate de (CA)n, între pozițiile 4150-4233, 4779-4834, iar secvența (AGC)n, între 7011-7056pb. Repetiții CA sau TG (microsateliți) sunt semnalate și aici în regiunile netranslate -3' UTR (**U**n**T**ranslated **R**egions) ca și în secvențele 3'UTR din gena *rbcS* (Goldschmidt și colab., 1986) și gena *cah1*(pentru sinteza anhidrazei carbonice) (Fukuzava, 1990). Morris și colab. (1986) estimează că aceste secvențe pot fi prezente în cca. 3000 copii/genom la *Ch.reinhardtii* și se pare că sunt alcătuite din ADN-Z (Rich și colab., 1984) intervenind în structura ADN și în exprimarea genelor.

În structura 3'UTR există secvența TGTAA ce se potrivește cu secvențele de recunoaștere pentru poliadenilare, descoperite în genomul din *Ch.reinhardtii* (Merchant și colab., 1990) și se află la 49pb, în aval de codonul STOP.(în cazul genei *arg7* zona cuprinsă între STOP și secvența de poliadenilare este mai scurtă ca în restul genomului).

5. ARHITECTURA GENEI PLASTIDIALE *psbA*

Principala funcție plastidială la alge și la plantele superioare este fotosinteza. Plastidele asigură îndeplinirea acestor funcții cu ajutorul informației genetice proprii de cca 20% și sunt dependente în proporție de 80 % de informația genetică nucleară. Una dintre genele majore pentru genomul plastidial, cu implicații profunde în fotosinteză, este și gena *psbA*. Gena *psbA* codifică proteina D1 (cu localizare tilacoidală). Localizarea genei *psbA* a fost demonstrată atât în cromozomul cianobacteriilor (Ex. *Anabaena; Synechococcus* și *Synehocystis*), cât și în ADNcp la *Ch, reinhardtii* (unde se află în 2 exemplare/ADNpl.) corespunzator fiecărei secvențe IR (din care face parte). La feofita *Dictyota dichotoma*, deși există două secvențe IR ce cuprind operonii ARNr, gena *psbA* este separată de acestea și se pare că există într-un singur exemplar.

La rodofita *Chondrus crispus* se întâlnește aceiași dispunere a genei *psbA* ca și la feoficee (1 gena *psbA*/ADNcp dublu catenar).

Un caz special îl reprezintă *Prochlorothrix hollandica*, o cianela ce poate fi menținută fără gazdă, în laborator și care, se consideră a constitui o linie evolutivă comună pentru cloroplaste și cianobacterii (Lewin, 1967). Gena *psbA* din *P. hollandica* a fost izolată (ca fragmente *EcoRI* 6.4-5.35Kb sau *BamHI* 3.0-2.9Kb) identificată cu o proba *psbA* din cianobacteria *Synechococcus PCC7942* (Golden și colab., 1986) apoi clonată și secvențiată. Secvența a fost comparată cu secvența omoloagă de la cianobacterii, *Chlamydomonas*, hepatica *Marchantia polymorpha* și plantele superioare. S-a constatat astfel că, în genomul de la *P.hollandica*, gena *psbA* se află în 2 exemplare ce codifică aceiași succesiune de AA. În cazul genei *psbA*, de la *Chlamydomonas* și plantele superioare, produsul acestei gene, proteina D1, prezintă 7AA ce întrerup continuitatea presupusă pentru capătul C al proteinei.

La cianobacteriile: *Anabaena PCC7120, Fremyella diplosiphon, Synechococcus 7942, Synechocystis 6803,* s-a constatat că acestea posedă 2 sau mai multe copii ale genei *psbA* (ce codifică însă două polipeptide diferite) (Curtis și Haselkorn, 1989; Golden și colab., 1986) în timp ce la majoritatea ADNcp există cel mult două gene *psbA*.

Secvența de AA a proteinei D1 sintetizată în cianobacterii este de 360AA, comparativ cu 353AA, găsiți în aceiași proteina, la *P.hollandica* și 352AA, de la *Chlamydomonas* și plantele superioare. Existența unei discontinuități la nivelul capătului C al proteinei D1, la *P.hollandica* față de cianobacterii, sugerează o mai mare apropiere filogenetică a acesteia față de cloroficee și plantele superioare și poate constitui o linie evolutivă derivată din cianobacterii și care a generat în final cloroplastele de la plantele superioare (Morden și Golden, 1989).

Studii de Southern-blotting, cu o proba *psbA* din spanac, efectuate de Kuhsel și Kovallik, 1987, la feofita *Dictyota dichotoma*, au arătat că genele *psbA* sunt strâns grupate cu genele *psbB* (gena pentru proteina de 51Kd. din FSII) și acestea sunt transcrise într-un ARNm policistronic ca și în cazul plantelor superioare. Inițial, experimentele de Southern-blotting au dovedit existența genei *psbA* într-un singur exemplar cu toate acestea majoritatea ADNcp de la alge (diatomea *Odontella sinensis*), de la plantele superioare (Palmer, 1985) și cianela *Cyanophora paradoxa* (Bohnert și colab., 1985) au câte 2 gene *psbA*/genom plastidial. Existența într-un singur exemplar poate fi explicată și prin omologia sondei cu gena *psbA*,de la *Dictyota*, de numai 82%. O altă caracteristică a genei *psbA*, la *Dictyota*, este și aceea referitoare la pozitionarea genei la 8Kb de secvența IR, din structura ADNcp, comparativ cu pozițiile adoptate la *Chlamydomonas* (în cele 2 secvențe IR), la diatomea *Olisthodiscus*, cu gena inclusă în secvența IR (Cattolico și Palmer, 1985).

Gena *psbA*, la *Dictyota*, se învecinează cu genele *psbC* (codifică apoproteina de 44Kd. a FSII) și *psbD* (proteina D2 a FSII) ca și la plantele superioare.

Experimentele de Southern-blotting, utilizând fragmentul de 500pb *HindIII - XbaI* ce conține gena *psbA* din spanac, asupra ADNcp din rodofita *Chondrus crispus* (Leblanc și colab., 1995) au relevat prezența genei *psbA* într-un singur exemplar și dispunerea ei departe de gena *psbB*.

Studiul la nivel de secvențe de baze a arătat că în cazul regiunilor promotoare de la *psbA* aceste au elemente comune cu cele de la procariote (zonele -35 si -10) (Cornelissen și Vanderwiele, 1988, Dzelkalns și colab., 1984). Aceste date sunt susținute și de experimentele prin care promotorii genei *psbA* pot funcționa atât în cianobacterii *Anacystis nidulans R2* (Dzelkalns, 1984), bacterii (*E.coli)*, dar și în ADN nuclear la *Nicotiana* (Cornelissen și colab., 1988).

6. GENELE NUCLEARE PENTRU ARNR 18S, 5.8S, 28S LA ALGE

Genele ribozomale nucleare se află dispuse repetat, într-un număr de cca 20copii/genom, în genomul nuclear al *cloroficeelor*. Aceste gene sunt grupate în ordinea 18S-5.8S-28S, între ele existând 2 regiuni numite spaceri ITS (Element de spațiere transcris / **I**nternal **T**ranscribed **S**pacer) a căror secvențe se modifică relativ rapid, în raport cu izolarea geografică și transformarea unor specii în noi specii, prin procesul de speciație. Secvența 5.8S este conservatoare și este importantă numai pentru studii moleculare, de filogenie între specii îndepărtate (Baldwin 1993, 1995;Nickrent, 1994). Analizele moleculare asupra ITS1 și ITS2 (Tabel 1) precum și asupra genei pentru ARNr 5.8S au fost efectuate la *Acrosiphonia arcta* (van Oppen, 1993), *Gonium pectorale* și *Pandorina morum* (Coleman și colab., 1992), la *Cladophoropsis membranacea* și *Struvea anastamosans* (Kooistra și colab., 1992), *Enteromorpha intestinallis / compressa, E.alheriana, E.flexuosa* (Leskinen și Pamilo, 1997), *E.linza, E.intestinallis, E.prolifera și Klebsormidium* (Sluiman și Tan, 1997). În cazul genului *Enteromporpha* se înregistrează cel mai mare conținut de baze CG în ITS, decelat până în prezent (65-70%), comparativ cu regiuni omoloage, de la alte alge (50-60%) și apropiat de plantele superioare (50-75%). Informațiile asupra ITS1 și ITS2, la genul *Enteromorpha* asociate cu morfologia talului (rizoizi) a permis stabilirea unei corelații între modificarea secvenței de nucleotide și morfologia unor specii supuse izolarii geografice (Leskinen și Pamilo, 1997).

Gena pentru ARNr 5.8S s-a dovedit a fi mult mai stabilă din punct de vedere al conținutului C+G (50%), la majoritatea algelor, iar secvența sa este înalt conservată, pretându-se bine studiilor profunde de taxonomie moleculară.

Studii de tip RFLP, folosind *HaeIII,* asupra ampliconilor 18-28S de la două izolate dulcicole de *Enteromorpha* au permis încadrarea lor în complexul de specii *E.intestinalis -E.compressa* (Vladimirescu și Gavrilă, 2003).

Cercetari similare, soldate cu secvențierea acestor spaceri și alcătuire de cladograme s-au efectuat la: *Charophyceae* (Meiers și Chapman, 1995) și la genul *Caulerpa* (Pillmann și colab., 1997) unde secvențele ITS1 și ITS2 au prezentat omologie între populații similare din Australia și Africa de Sud. În acest caz, o diferență de 8 nucleotide din structura genei 5.8S a permis cercetătorilor să afirme că se poate vorbi despre specii criptice, printre aceste populații.

La algele roșii și brune, cistronii ribozomali 18-28S au fost secvențiați la *Costaria costata* -alga bruna (Bhattacharya și Druehl, 1987) iar genele 18 S, la alga roșie *Gracilaria sp.* (Bird și colab., 1990, 1992) precum și la algele brune *Chorda, Dictyosiphonia, Dictyota, Ectocarpus și Fucus.* (Tan și Druehl, 1993. Numeroase studii de tip RFLP, efectuate pe ampliconii 18-28S, au pus în evidență fenomene de speciație și filiație între populații algale izolate sau nu reproductiv și/sau geografic, precum *Costaria* (Bhattacharya și Druehl, 1987); *Gracilaria și Gracilariopsis* (Sholfield si colab., 1991), Analizele cladistice efectuate de.Craig-Bailey și Chapman (1996) asupra secvențelor 18 S au arătat filiația și diversitatea genetică în cazul algelor *Corallinaceae (Rhodophyta)* la care depozitele de calciu și imposibilitatea de studiere a gameților a pus probleme de taxonomie clasică.

Tabel 1. Numarul de nucleotide (n) și conținutul de G + C % din ITS1 și ITS 2 precum și în gena pentru ARNr 5.8S, la câteva alge verzi (van Oppen și colab.,1993 ; Bakker și colab.,1992 ; Kooistra și colab. ,1992 ; Coleman și colab.,1994 după Leskinen și Pamilo, 1997).

	ITS 1		5,8 S		ITS 2	
Alge verzi (*Chlorophyceae*)	n	C+G %	n	C+G %	n	C+G %
Pandorina morum	229	48,5	158	46,8	234	51,3
Gonium pectorale	227	48,5	158	48,7	224	52,7
Struvea anastomosans	416	54,3	155	48,4	291	54,4
Cladophora albida	525	59,9	159	47,8	311	56,9
Cladophoropsis membranacea	421	54,2	155	48,4	299	50,8
Acrosiphonia arcta	195	48,7	157	49,0	180	51,5
Enteromorpha intestinalis/compressa, haplotip 1	195	65,1	160	48,8	186	69,9
E. intestinalis /compressa haplotip 2	195	65,6	160	48,8	186	70,4
Enteromorpha ahlneriana	195	68,2	160	49,4	180	68,9
Enteromorpha flexuosa	209	66,0	160	48,8	186	69,9

7. GENELE PLASTIDIALE PENTRU ARNr :16S, 23S, 5S

Genele pentru ARNr intră în constituția secvențelor IR. Ca urmare, există 2 copii din fiecare genă (genele pentru ARNr 16S, 23S, 5S) pentru fiecare ADNcp circular. Absența secvențelor IR din ADNcp la *Pisum sativum, Phaseolus sp, Euglena Z-S* a sugerat că existența a două exemplare din aceste gene nu este esențială, dar prezența lor în dublu exemplar pare să aibă un efect stabilizator, în fața fenomenelor de recombinare și mutație pe care le suferă ADNcp (Bedbrook și colab., 1979). La *Euglena* au fost descoperite câte 3 exemplare din fiecare gena pentru ARNr (3 copii ale operonului pentru ARNr).

În cazul bacteriilor (*E.coli*) și al cianobacteriilor, genele din ARNr sunt organizate în operoni, în urmatoarea ordine: 5'-16S-23S-5S-3', fiind prezente în 7 exemplare, la *E.coli* și 2 exemplare sau mai multe, la *Anacystis nidulans* și dispersate în ADNcromozomal. Acești operoni au dimensiuni de cca. 7.2-7,4Kb și au în compunere și gene pentru ARNt (pentru Ile și Ala) separate prin mici spațiatori de genele 16S și respectiv, 23S (fig. 3). O organizare asemănătoare cu cea precedentă se întâlnește la operonul pentru ARNr de la *Euglena,* iar acesta este dispus în tandem (repetat de cca 3ori) în secvența IR.

O structură aparte o are operonul pentru ARNr, de la *Chlorella sp* , între gena pentru 16S și cea pentru 23S se află un spațiator de aproximativ 6,8-7Kb. ce conține 3 ORF-uri și o singură genă pentru ARNt (pentru Ile). Spre deosebire de *Chlamydomonas,* la care spațiatorul este prezent (dar nu există și ORF) la *Chlorella* sunt prezente numai genele pentru IleARNt și AlaARNt ce întrerup zona 16S-23S. La *Ch. reinhardtii* apar regiuni noi, de tip 7S și 3S, iar gena 5S este mai bine reprezentată, comparativ cu *Chlorella.*

Tot la *Chlamydomonas,* gena 23S conține un intron de 888pb. (Rochaix și Malnoe, 1978: Rochaix și colab., 1985). În interiorul acestui intron se găsește o secvență de 489pb,.ce codifică o maturază (Rochaix și colab., 1985) și este asemănătoare elementului P1 din intronii din grupul I din ADNmt (Michel și colab., 1982).

Promotorul în cazul operonului pentru ARNr de la *Nicotiana* este urmat imediat de o gena ARNt pentru Valină, identică cu cea de la *Euglena.* Structura 16S-23S este întreruptă de câte două exemplare din genele pentru

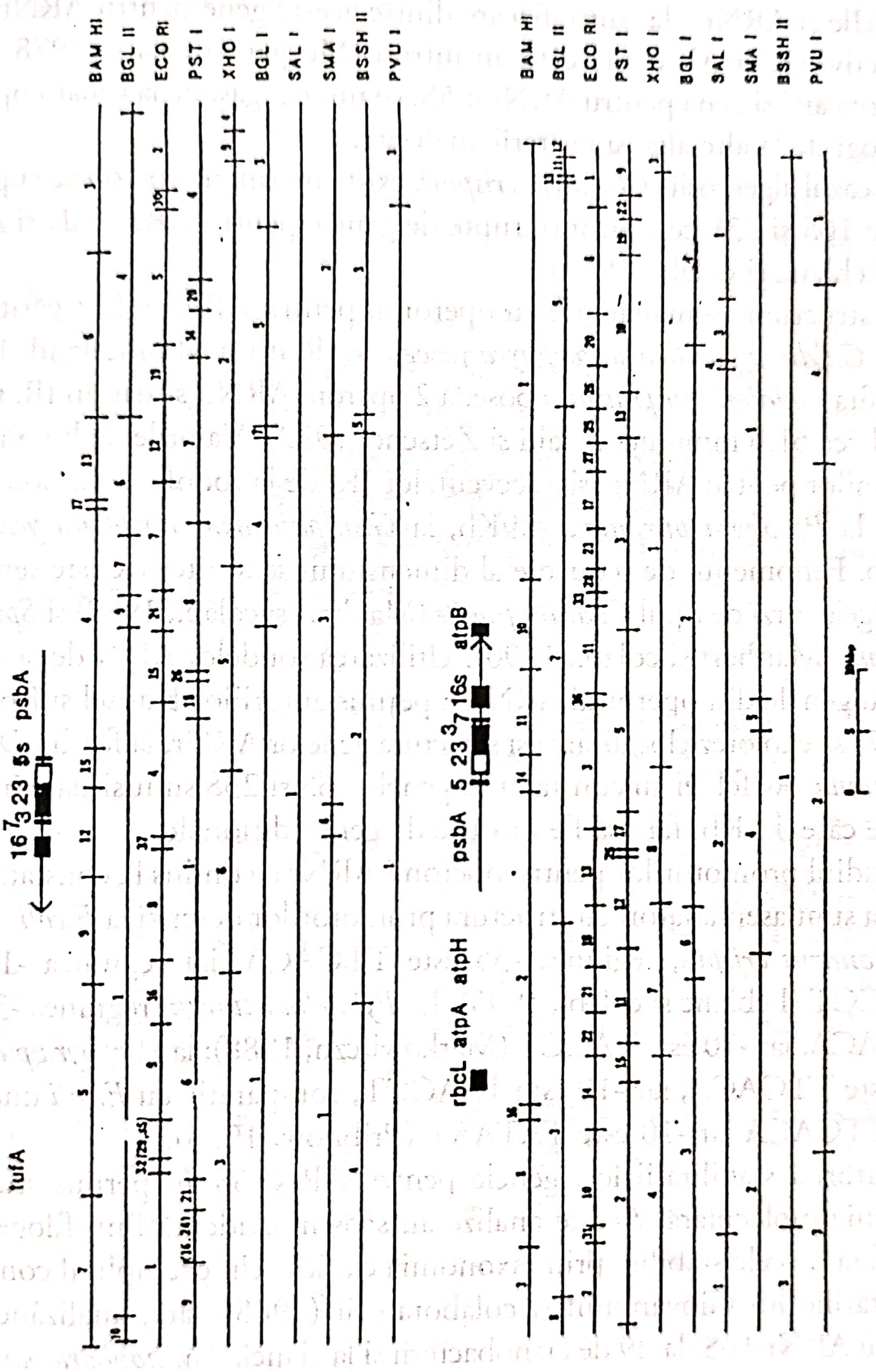

BAM HI
BGL II
ECO RI
PST I
XHO I
BGL I
SAL I
SMA I
BSSH II
PVU I
tufA
16 7 3 23 5s psbA
rbcL atpA atpH
psbA 5 23 3 7 16s atpB
0 5 10 kb

Fig. 3A — Hărțile fizice și de restricție pentru zonele IR și genele adiacente de la ADNcp, la *Chlamydomonas reinhardtii*. Se observă localizarea operonilor pentru ARNr (genele 5, 16 și 23S), genelor structurale (*psbA*, *atpA*, *atpB*, *atpH* și *rbcL*) sau importante în sinteza proteinică (gena *tuf*- pentru factorul de elongație Tu) (după Harris, 1989).

ARNtIle și ARNt Ala. Între fiecare dintre aceste gene pentru ARNt Ile și respectiv ARNt Ala există câte un intron (Morgan și colab., 1978). Este prezentă aici și gena pentru ARNr 4.5S, ce nu se regăsește la ceilalti operoni omologi de la alte alge și bacterii analizate.

În cazul algei roșii (*Chondrus crispus),* există un singur operon ce cuprinde genele 16S și 23S ce sunt întrerupte de genele pentru ARNt Ala și ARNt Ile. (Leblanc și colab., 1995).

O structură asemănătoare cu operonul pentru ARNr a fost găsită și la algele *Galdiera pacifica* și *Porphyra yezoensis.* (Reith și Munholland, 1993). Rodofita *Galdieria sulphuraria* posedă 2 operoni ARNr, situați în IR, fiecare având cca 5Kb lungime. (Maid și Zetsche, 1992). Valorile de lungime ale operonilor pentru ARNr (și a secvențelor IR) de la rodoficee variază foarte mult: la *Porphyra purpurea,* 4.9Kb, la *G.sulphuraria, Porphyra yezoensis,* 6.6Kb. Fenomenul de reducere al dimensiunii secvenței IR este semnalat și la algele verzi de tipul *Codium fragile* (Manhart și colab., 1989) și *Spirogyra maxima* (Manhart și colab., 1990). Utilizarea sondelor ADN de la spanac pentru genele din operonul ARNr, a permis autoriilor Kuhsel și Kowallik (1987) să exploreze localizarea și structura genelor ARNr, la feofita *Dictyota dichotoma.* Astfel, ei au constatat că genele 16S și 23S sunt situate în două IR, de câte 4.7Kb, fără să fie însoțite de gene adiționale.

Studiul promotorilor pentru operonii ARNr a condus la constatarea că aceștia sunt asemănători cu structura promotorilor descriși la *E.coli.* Astfel, la *Chondrus crispus,* regiunea -35 este TTGACA, iar regiunea -10 este TAACCT (Leblanc și colab., 1995). La *Pylaiella littoralis* regiunea -35 este TTGACA, iar -10 este TACCT (Markowitczn, 1988); la *Porphyra purpurea* -35 este TTGACA, iar -10 este TAACCT, comparativ cu *E.coli* unde -35 este TTGACA iar -10 este TATAAT (Pribnow, 1975).

Datorită stabilității lor, genele pentru ARN16S au permis studii de filogenie moleculară. Aceste analize au scos în evidență linii filogenetice noi, față de cele stabilite prin taxonomia clasica. Un exemplu îl constituie cercetăriile lui Giovanonni și colaboratorii (1988) care, analizând gena pentru ARNr 16S, la 29 de cianobacterii și la cianela *Cyanophora paradoxa,* au constatat că majoritatea cianobacteriilor s-au diversificat într-un timp evolutiv scurt, față de timpul necesar diversificării eubacteriilor cunoscute astăzi, sugerând că cianobacteriile și cloroplastele s-au diversificat pornind de la un ancestor comun. În sprijinul acestei teorii vin și alte dovezi experimentale de tipul acelora rezultate prin compararea secvenței genelor 16S, din ADN-ul genomic de la eubacterii și cianele, cianobacterii și din ADNcp de la cloroficee, feoficee, rodoficee, euglene și criptomonade (Saitou și Nei, 1987) (fig. 3). Din analiza acestui arbore evolutiv se constată clar că rodoplastele nu sunt așa înrudite (precum se credea până acum!) cu cianobacteriile, iar feoficeele sunt relativ apropiate de modelul de organizare și funcționare al genelor de la ADNcp din plantele superioare. Comparația între secvențele 16S, de la *Mallomonas papillosa* dintre *Synurophyceae*, de la *Tribonema aequale* (*Xanthophyceae*) precum și de la alte eucariote au arătat legături filogenetice strânse între *Synurophyceae* și *Chrysophyceae,* precum și între *Xanthophyceae* și *Phaeophyceae.* Analizele bazate pe stabilirea distanței genetice și analiza cladistică bazată pe parsimonie au arătat că, în acest caz, avem de-a face cu un ansamblu de evolutiv de cromofite, a căror linie evolutivă clară nu este încă stabilită.

8. ELEMENTE REPETITIVE CARACTERISTICE UNEI SPECII/TULPINI DE ALGE VERZI

Odată cu perfecționarea metodelor de electroforeză în câmp pulsatoriu, s-a reusit izolarea unor cromozomi întregi sau a unor fragmente mari de RFLP. Astfel, pentru *Chlorella vulgaris C-169* s-a stabilit că din totalul de 16 cromozomi, 9 sunt mai mari față de o tulpină înrudită *Chl.vulgaris C-169,* fapt ce a condus la ipoteza existenței unei arhitecturi diferite a elementelor repetitive în cele două tulpini.

Studiile de CHEF (Contor Clamped Homogenous Electric Field) au diversificat informatiile acumulate pentru CLP (Chromosome Lenght Polymorfism), referitoare la genul *Chlorella.* Împreună cu utilizarea enzimelor *BstUI* (izoschizomera cu *AccII*) ce recunosc secvența palindromică 5'-CGCG-3' din ADNnuclear la *Chl.ellipsoidea C-87,* urmată de clonarea fragmentelor rezultate și secvențierea acestora, Aimi și colaboratorii (1993) au pus în evidență două familii de elemente repetitive ce au o secvență comună cu structura 5'-GCCAAACGTCTCTGG-3'. Prima familie de elemente repetitive a cuprins secvențele: p403(940pb); p307(716pb), p320(722pb). Conținutul de C+G=55% cu o omologie între ele de 95%.

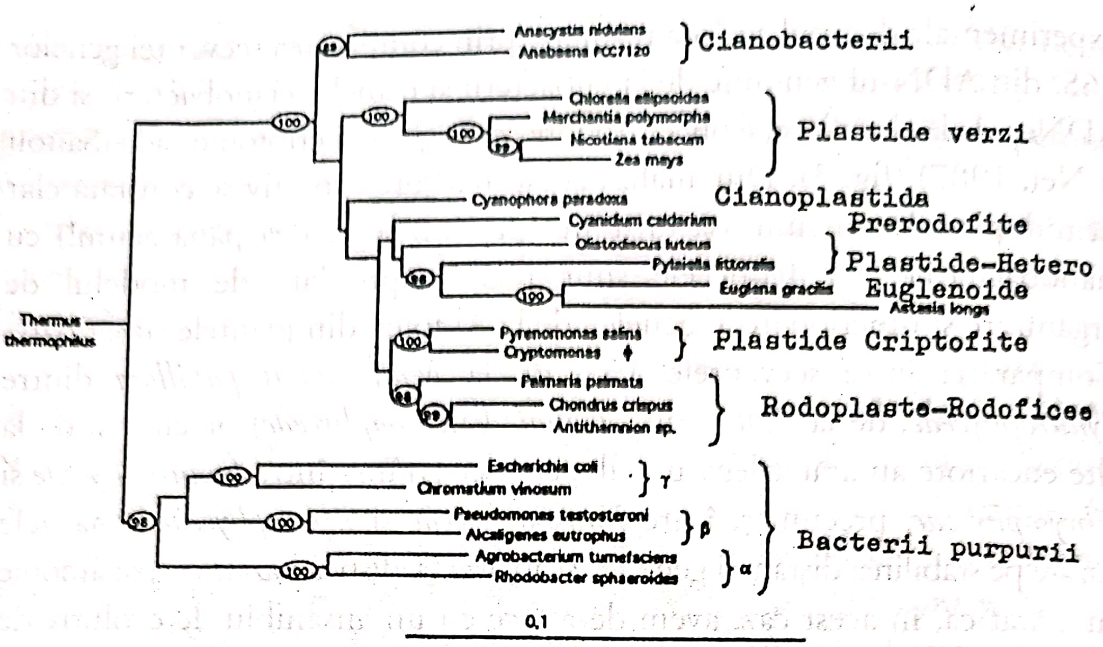

Anacystis nidulans
Anabaena PCC7120
Cianobacterii
Chlorella ellipsoidea
Marchantia polymorpha
Nicotiana tabacum
Zea mays
Plastide verzi
Cyanophora paradoxa
Cianoplastida
Cyanidium caldarium
Prerodofite
Olistodiscus luteus
Pylaiella littoralis
Plastide-Hetero
Euglena gracilis
Euglenoide
Astasia longa
Thermus thermophilus
Pyrenomonas salina
Cryptomonas
Plastide Criptofite
Palmaria palmata
Chondrus crispus
Antithamnion sp.
Rodoplaste-Rodoficee
Escherichia coli
Chromatium vinosum
γ
Pseudomonas testosteroni
Alcaligenes eutrophus
β
Agrobacterium tumefaciens
Rhodobacter sphaeroides
α
Bacterii purpurii
100
100
100
98
100
100
98
98
100
100
0,1

Fig. 3B — Dendrograma reprezentând înrudirea diferitelor tipuri de cloroplaste, după analiza secvenței genelor pentru ARNr, din ADNcp (după Saitou și Nei, 1987). Notă: în cazul procariotelor, s-a analizat structura genei 16S, din cromozom.

A doua familie de elemente repetitive a cuprins secvențele: p430 (813pb); p329 (706pb). Conținutul C+G= 58%. Omologia între cele două familii de secvențe a fost estimată la 40%. Într-un genom estimat la *Chl.ellipsoidea C-87* de cca. 40Mb (Yamada, 1982) elementele p403 și p430 sunt prezente într-un număr de 50/genom, comparativ cu 20 copii/genom pentru genele ARNr. Aceste elemente repetitive se regăsesc în toți cei 9 cromozomi ai tulpinii și sunt caracteristice acesteia. Experimentele de Southernblottig, întreprinse pe tulpinile *Chl.vulgaris C-169* și *Chl.saccharophila C-211* cu probe din elementele repetitive, nu au pus în evidență prezența acestora în tulpinile analizate.

9. EVOLUȚIA NUCLEOLULUI LA ALGE CONJUGATE

Nucleolii la *Conjugate* diferă și din punct de vedere al comportamentului, în timpul diviziunii, comparativ cu alte alge. Astfel, Geitler , în anul 1935, a descris pentru prima dată, prezența și distribuția substanței nucleolare (ce este denumită și substanța lui Geitler) la 3 specii de *Spirogyra*. Primul eveniment ce se petrece în profază este dezorganizarea nucleolului, iar aceasta se poate realiza în 3 moduri (Godward ,1953) diferite:

a) dezorganizarea graduală, urmată de împrăștierea substanței nucleolare în nucleu;

aa) dezorganizarea bruscă a nucleolului, urmată de asocierea substanței nucleolare în globule sau granule;

aaa) dezorganizarea totală a nucleolului.

După dezorganizarea nucleolului, substanța lui Geitler se depozitează pe cromozomi, în diferite moduri, la diferitele specii de conjugate , constituind un caracter citotaxonomic.

La *Spirogyra crassa*, această depozitare se desăvârșește în Metafază. Depozitarea substanței lui Geitler pe cromozomi produce un efect de *stickiness* asupra comozomilor.(Godward ,1953). Nucleolii se reconstituie în Telofază pe baza materialului vechi, dar și nou sintetizat în vecinătatea regiunii organizator-nucleolare a cromozomilor.

În cazul algei model *Spirogyra*, nucleul interfazic are dispunere centrală și este înconjurat de citoplasmă, fiind susținut prin punți citoplasmatice. În Profază, aceste punți se subțiaza și sunt lipsite de microtubuli. La nivelul polilor de pătrundere a microtubulilor în nucleu, în timpul Prometafazei, apar goluri în membrana nucleară, iar cromatina se atașează microtubulilor (Foke și colab.1969).

În timpul Metafazei-Anafazei, materialul nucleolar este atașat de cromozomul organizator nucleolar (Fig. 4) . În cursul diviziunii, întreg nucleul se transformă în fus de diviziune de tip butoiaș, cu poli largi și plați, lipsiți de centrozomi. În vederea separării celulelor-fiice , ia naștere o formațiune caracteristică, alcătuită din citoplasma granulară, atașată ecuatorial la fus, la nivelul căruia generează un disc celulozo-pectic perforat, care clivează în două discuri ce vor constitui viitoarele membrane separatoare ale celor două celule-fiice.

Metafaza I din meioza este asincronă și nu se soldează cu dispunerea bivalenților într-o placa ecuatorială, separarea bivalenților fiind asincronă, iar din 4 produși ai meiozei 2 avortează.

Inițial, conjugatele au fost considerate a prezenta un centromer difuz (King, 1953). Cromozomii conjugatelor posedă 1-2 centromeri/cromozom, având o structură asemănătoare cu cei de la *Cladophora* (Maghal și colab., 1973), sau pot fi policentrici, așa cum s-a evidențiat la *Spirogyra* și *Zygnema*.

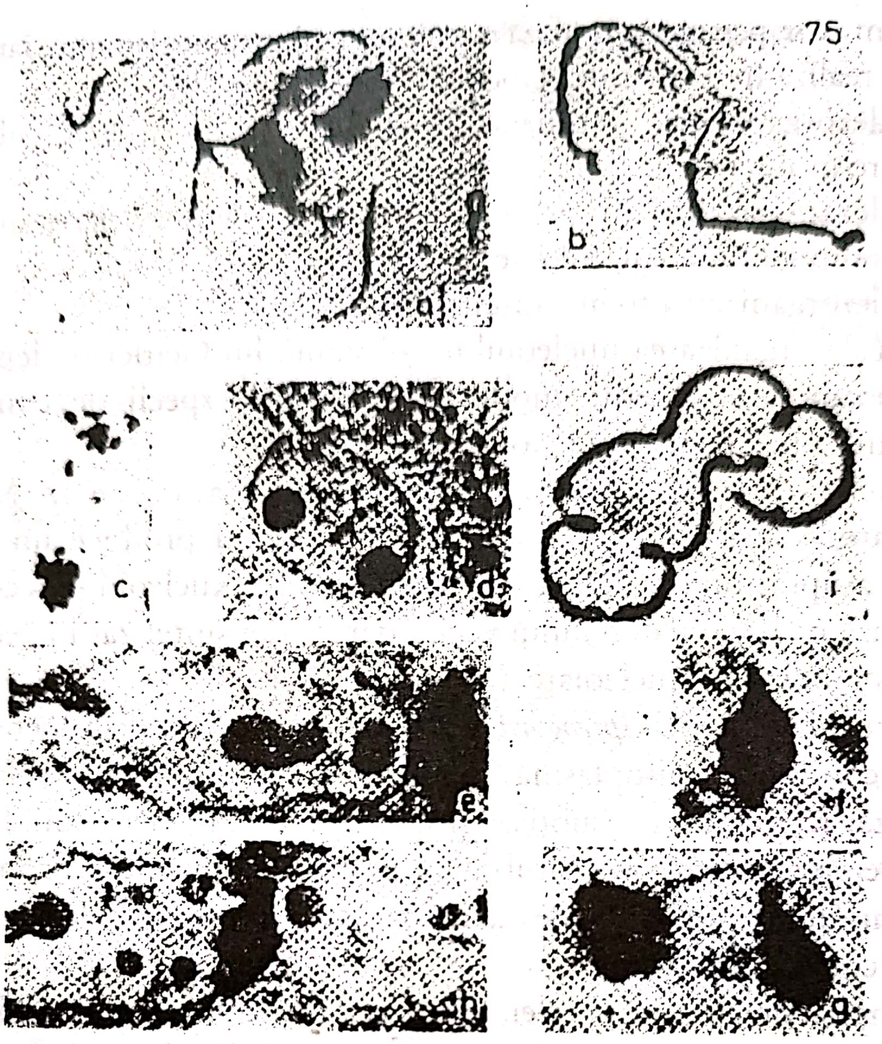


Fig. 4 — Nucleul și diviziunea sa la Conjugate. a, *Spirogyra triformis*, Profaza cu 6 cromozomi, 2 lungi, 2 scurți și 2 organizatori nucleolari (NO); b, reprezentarea schematică a cromozomilor NO, cu regiunile NO înconjurate de resturile de material nucleolar; c, Anafaza la *Spirogyra sp.*; d, sfârșitul diviziunii nucleare, cu persistența membranei nucleare; e-h, diviziunea nucleului la *Closterium sp.*; i, diviziunea celulară la *Cosmarium sp.* (a, b, după Godward, 1966 și c-i Gavrilă, 1978, din Gavrilă, 1978).

Natura policentrică a cromozomilor este unică pentru *Conjugate*. Geitler în 1930, este cel care a constatat dispunerea în unghi drept a cromatidelor surori (dreapte și ușor sinuoase) fața de axul reprezentat de fusul de diviziune în Metafaza și disjuncția lor paralelă în Anafază. Ulterior, Godward (1953) a denumit acești cromozomi cu centromer -difuz, policentrici. Confirmarea ultrastructurală (Mughal și Godward, 1973) a subliniat existența a doi kinetocori și existența unor centromeri difuzi, la *Spirogyra*.

Cromozomii organizator nucleolari posedă câteva caracteristici unice față de alte alge (Fig. 4): studiile de microscopie electronică au pus în evidență în mod indubitabil faptul că fibrele de cromatină ale acestor cromozomi traversează nucleolul și la acest nivel apar bucle laterale asemănătoare celor întâlnite la cromozomii lampbrush sau pufele cromozomilor politeni, dovada funcționarii lor ca matriță pentru sinteza ARNr.

Cromozomii pot fi foarte mici de 02-2µm, la *Mougeotia* sau ei pot fi gigantici, de 20µm, așa cum se întâlnesc la *Triploceras verticillatum*. În cazul algei *Spirogyra*, în Metafază se evidențiază 8 cromozomi, în placa ecuatorială (Geitler și colab.1930; Gavrilă, 1973), dar și 2 cromozomi (Tatuno și Iilyama ,1971; Abhayavardhani și Sharma, 1983), fiind cel mai mic număr de cromozomi întâlnit până acum la cloroficee și la plantele superioare.

La *Spirogyra crassa* (Godward, 1958), în Diachineză, apar bivalenți cu 4 cromatide distincte, cu 2-4 chiasme. La conjugate ,diviziunea meiotică are loc la germinarea zigosporului sau la formarea acestuia (*Spirogyra*). Există tendința de împerechere a cromozomilor, chiar din profaza mitotică, fapt ce generează rase cromozomale cu o frecvență crescută în laborator, dar redusă în natura. Apariția raselor cromozomale a progresat odată cu dispariția fenomenelor sexualității (același comportament ca și la *Chaetophorales*). Desmidiaceele sunt conjugate haploide (n) în stadiul vegetativ, pe când zigosporul este 2n. Se consideră că la *Netrium digitus* , datorită unor fenomene de duplicație genică, se întâlnesc până la 30-544 cromozomi (numărul record de cromozomi de la alge !) (King , 1953).

Poliploidia și aneuploidia sunt fenomene frecvente la *Spirogyra, Netrium* și *Cosmarium.* Mecanismul de apariție al seriilor aneuploide (la *Spirogyra,* între 4-70 cromozomi) este fragmentarea cromozomilor (agmatoploidia), fenomen întâlnit și la plantele superioare ai căror cromozomi posedă centromeri difuzi.

10. CHAROPHYTA

Charophyceae-le reprezintă cele mai evoluate alge și ele cuprind trei mari genuri *Chara, Nitella* și *Tolypella*. Nucleul interfazic la *Nitella* are aspect reticulat, mai mult sau mai puțin cromocentric, iar la *Chara* este reticulat cu cromocentri.

Mitoza este tipică, în special în zonele talului cu creștere activă. În Profaza timpurie se produce o colorație preferențială a cromatinei ce capată aspect moniliform.

În celulele internodale vechi, din caulidiu, diviziunea este de tip amitotic (Sawa, 1965). Amitoza face ca nucleul să adopte formă de inel, iar în urma sciziunii acestuia să se formeze 2 semicercuri înconjurate de citoplasmă .

În Metafază cromozomii caroficeelor prezintă deosebiri față de cromozomii plantelor superioare. Cromozomii mari pot fi metacentrici sau submetacentrici, iar cromozomii mici sunt, de regulă, telocentrici sau acrocentrici, unii dintre aceștia posedând și sateliți.

Forma cromozomilor este diferită, întâlnindu-se cromozomi sferici sau în forma de U de V sau de arc de cerc deschis. Meioza are loc la germinarea zigotului, rezultând plante haplobionte, cu meioză zigotică, meioza generând gametangii. Numărul de cromozomi este x=n=7, pentru *Chara,* x=n=3/6 pentru *Nitella* și x=n=5, pentru *Tolypella.* Numărul de cromozomi înregistreaza o variație, chiar și în cazul aceluiași tal. Astfel, *Chara foetida* dispune în celulele vegetative de x=n=16-18, fenomen asemănător (aici este o eliminare) aceluia de la angiosperme, cu reproducere vegetativă sau *Plantago coronopus,* la care apar cromozomi atipici (cromozomi de forma inconstantă).

Dimensiunile cromozomilor sunt de .1.8-9µm , la *Nitella,* pe când la *Chara,* dimensiunea acestora este mai uniformă. În cazul *Chara oedophylla,* s-au evidențiat și heterozomi.

Trecerea de la formele dioice la cele monoice se datorează modificării numărului de cromozomi. La caroficee, între determinismul cromozomal ,al sexului și valoarea numărului de bază de cromozomi x este o relație directă. Speciile dioice de *Chara* au 12/14 cromozomi, iar cele monoice au 28 cromozomi. La *Nitella,* speciile dioice posedă 6/12 cromozomi, pe când cele monoice și dioice de la *Tolypella* au 10 cromozomi.

Auto -și alopoliploidia sunt căi de speciație, poliploidia generând specii monoice sau apariția unor intermediari între monoice și dioice, așa cum sunt speciile: *Chara oedophylla, Ch.vulgaris.subsp. crassivoulis var.segregata* cu n=14 cromozomi.

În urma hibridării și poliploidiei au rezultat rase cromozomale, așa cum sunt cele de la *Ch braunii,* la care se întâlnesc aberații cromozomale incluzând

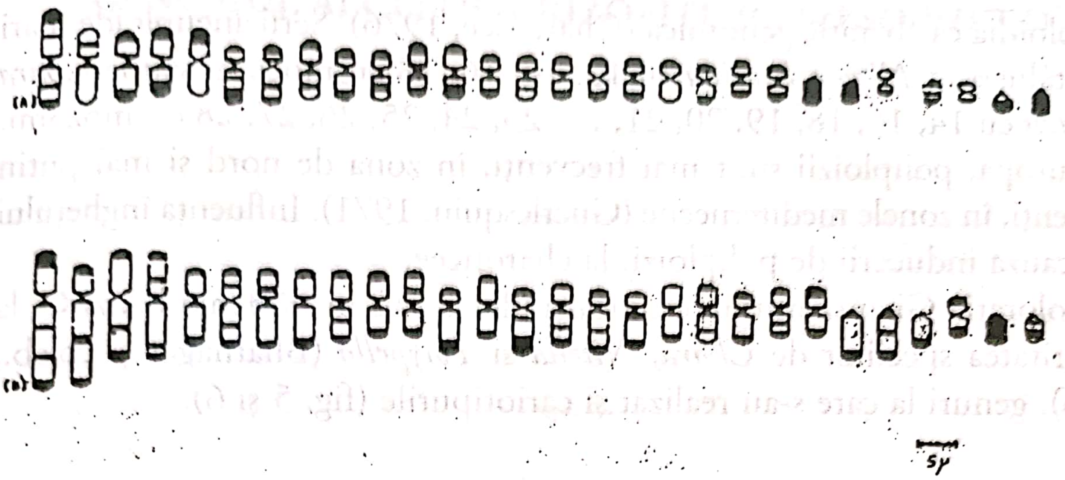


Fig. 5 — Cariotip și bandare C la *Charophyta* (genul *Chara*) A – *Chara vulgaris f. vulgaris* (n=28) și B – *Chara vulgaris f. contraria* (n=28) (după Bhatnagar și colab., 1996).

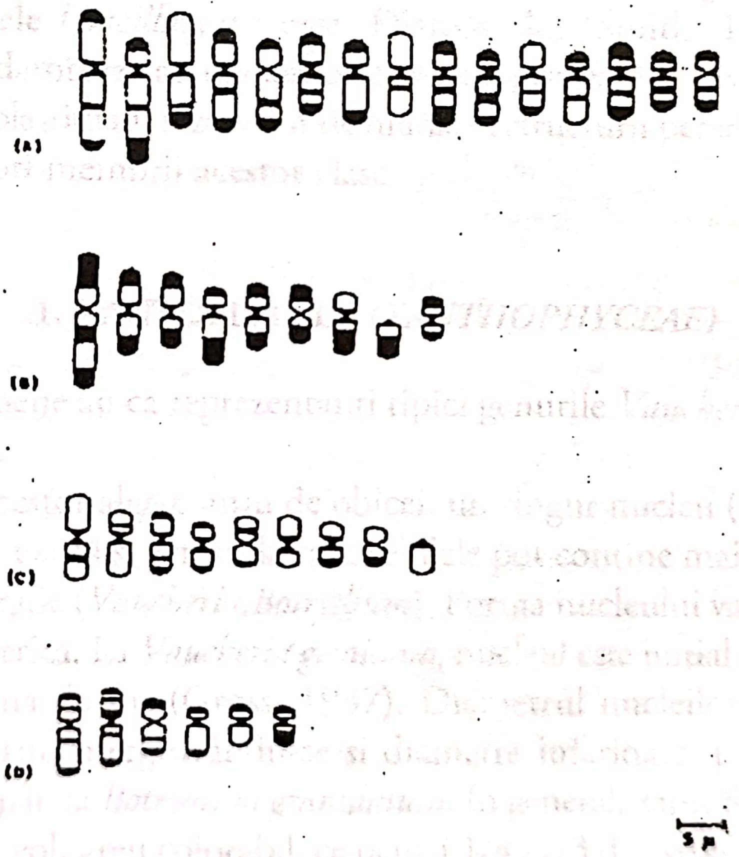


Fig. 6 — Cariotip și bandare la *Charophyta* (genul *Nitella*) A – *Nitella furcata f. roxburghii* (n=18), B – *Nitella dualis f. dualis* (n=9), C – *Nitella dualis var. pulchella f. superba* (n=9), D – *Nitella mirabilis f. mirabilis* (n=6) (după Bhatnagar și colab., 1996).

poliploidia ca aberație genomică (Chatterjee, 1976). Serii aneuploide mari se întâlnesc la *Nitella hyalina* cu 12, 14, 16, 18 cromozomi sau la *Chara vulgaris* cu 14, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 cromozomi. În Europa, poliploizii sunt mai frecvenți, în zona de nord și mai puțin frecvenți, în zonele mediterneene (Guerlesquin, 1971). Influența înghețului este cauza inducerii de poliploizi, la charoficee.

Colorația Giemsa asupra cromozomilor a pus în evidență benzi C, la majoritatea speciilor de *Chara, Nitella* și *Tolypella* (Bhatnagar și colab., 1996), genuri la care s-au realizat și cariotipurile (fig. 5 și 6).

CAPITOLUL XXVIII

GENOMUL ALGELOR CRIZOFITE *(CHRYSOPHYTA)*

Cunoscute inițial drept algele aurii, aceste alge au ca reprezentanți tipici pe *Ochromonas danica, Mallomonas sp., Dinobryon sp.* Grupul înglobează atât crizoficeele cât și xantoficeele (*Xantophyceae* - Algele galbene) și bacillarioficeele (*Bacillaryophyceae-* Diatomeele) (Smith, 1955). Această încadrare se datorează asemănărilor ce se înregistrează la nivelul flagelilor, pigmenților plastidiali, rezervelor de hrană, al structurii pereților și formării sporilor, la toți membrii acestor clase.

1. XANTOFICEELE *(XANTHOPHYCEAE)*

Algele galbene au ca reprezentanți tipici genurile *Vaucheria, Botrydium* și *Tribonema.*

Celulele acestor alge conțin de obicei, un singur nucleu (la majoritatea speciilor), dar există și genuri la care celulele pot conține mai mulți nuclei, fiind polienergide (*Vaucheria,Botrydium*). Forma nucleului variază de la cea ovală, la cea sferică. La *Vaucheria geminata*, nucleul este inițial sferic, ulterior căpătând forma de fus (Gross, 1937). Diametrul nucleilor variază între limitele 3-5 μm, înregistrându-se și diametre inferioare, pentru nucleul interfazic: 1,5μm la *Botrydium granulatum.* În general, xantoficeele prezintă un singur nucleol, greu colorabil, ce ocupă 1/4 -1/3 din volumul nucleului (Sharma, 1992).

Studiile de TEM au arătat că ultrastructura nucleului la *Bumilleria sicula* și *Tribonema vulgare* respectă planul de organizare tipic eucariot, cu câteva particularități:

-porii nucleari au dimensiunea de 80nm diametru și o dispunere în linii drepte (Massalski și Leedale, 1969), ceea ce constituie o asemănare cu porii nucleari ai plantelor superioare (Yoo și Bayley, 1967).

-membrana externă nucleară se contopește cu cisterna externă plastidială (aparținând RE) formând un *continnuum* - structură ce poartă numele de CER (**Chloroplast Endoplasmic Reticulum**) Această structură se întâlnește și la unele feoficee (alge brune).

- La *Bumilleria*, zonele lipsite de pori pot prezenta complexe Golgi apropiate de membrana externă nucleară, iar numeroase vezicule fac legătura între nucleu și aparatul Golgi.

În nucleu s-au pus în evidenta și cromocentrii de diverse dimensiuni.

Diviziune mitotică. Gross, în anul 1937, demonstrează că la *Vaucheria geminata* diviziunea este similară atât în filamentele vegetative cat și în cele anteridiale, cariokineza fiind complet intranucleară (mitoza intranucleară). La *Tribonema*, diviziunea începe prin mărirea volumului nuclear, urmată de dezintegrarea acestuia și a nucleolului (Abbas și Godward, 1967) în momentele incipiente sau de mijloc ale Profazei (Agrawal și Chaudhary, 1996). La nucleii vegetativi de la *Vaucheria sessilis* s-a constatat după dezintegrare, că nucleolii sunt înlocuiți de structuri nucleare **heterocromatin -like.**

Centriolii sunt situați în afara nucleului și adiacenți acestuia, iar în Metafază se mai formează câte o pereche de centrioli, la fiecare pol. Nu s-au observat centromeri distincți, iar membrana nucleară este intactă, exceptând porțiunea dinspre poli unde apar niște goluri și pe unde membrana nucleară se asociază cu dictiozomii.(Gavrilă, 1978).

Placa metafazică este înghesuită și cuprinde cromozomii cu cromatide scurte și cu regiuni necolorate. Placa anafazică este perpendiculară pe ecuator și poate apare frecvent nondisjuncția cromozomală. În mitoză nu are loc clivarea centromerului.

Nucleul se alungește în telofază și se separă de microtubulii continui ai fusului, în final din nucleul alungit rezultă doi nuclei fii; cariokineza nefiind urmată de citokineză, rezultă celule multinucleate.

Meioza are loc la germinarea oosporului (Hanatschek,1932; Gross,1937).

În prezent, există date referitoare la numărul de cromozomi pentru 36 de taxoni aparținând *Xanthophyceaelor* (Agrawal și Chaudhary, 1996). În general, aspectul acestor cromozomi este înghesuit (agregat) așa cum apar la *Vaucheria hamata* Walz. Din complementul de n=10 cromozomi, 8 apar ca niște segmente scurte și groase, iar doi sunt ceva mai mari și cu o structură mai distinctă. La *Tribonema* au fost descriși cromozomi scurți, ce prezintă cromatide ce nu se colorează și pentru care este dificil de spus dacă aceste regiuni corespund sau nu unor centromeri (Agrawal și Chaudhary,1996).

Mărimea cromozomilor variază în domeniul 0.3-1.2µm sau 0.8-1.63µm la *Botrydium granulatum var.eurganulatum.* (Sharma,1992).

Numărul cel mai mic de cromozomi (n=5) se întâlnește la *Vaucheria geminata,* iar numărul cel mai mare (n=24), la *Botrydium tuberosum var.intermedium.*

Abbas și Godward (1963) au arătat existența a două tulpini distincte (A și B) de *Tribonema urticulosum*, cu n=15 și, respectiv, n=17 cromozomi; apariția acestor variații se poate datora separării inegale a cromozomilor. Studiile ulterioare au demonstrat rolul major pe care îl joacă aneuploidia față de euploidie, în speciația la *Xanthophyceae.*

2. CRIZOFICEE *(CHRYSOPHYCEAE)*

Algele aurii. Datorită dificultăților de observare și cultivare în laborator, datele referitoare la genetica acestor organisme se reduc la studii de microscopie electronică și de biochimie (Agrawal și Chaudhary,1996).

Aceste alge sunt în general uninucleate și prezintă un nucleol unic, de mari dimensiuni.

Nucleul este piriform și dispus aproape central (*Mallomonadaceae*), iar la *Pseudopendinella pyriforme Carter*, acesta este mare, central și sferic și prezintă o depresiune apicală, zona în care baza flagelilor intră în contact cu membrana nucleară (Ostroff și Valkenberg, 1978). Nucleul la *Mallomonas caudata* este situat între cei doi lobi ai cloroplastului (Wujec și Kristiansen, 1978).

Cromatina la *Olisthodiscus luteus* prezintă asemănări de formă și dimensiuni la nivel de nucleosomi cu cea de la șoarece. Asocierea ADN cu histonele generează structuri nucleozomale asemănătoare cu cele ale plantelor superioare și animalelor (Rizzo și Burghardt, 1980).

Membrana nucleară este dublă, aparent continuă cu cea plastidială și cu reticulul endoplasmic și este perforată de pori de $0.1\mu m$ diametru (Belcher,1969; Wujek, 1976). Asocierea între nucleu și dictiozomi pare să fie o caracteristică constantă la crisomonadine (Durrschmidt, 1989). Membrana externă nucleară vine în contact cu cisterna periplastidială (ce îmbracă plastida), aparținând RE și formează o structură tip CER.

La câteva crizoficee s-a studiat mitoza (Slankis și Gibbs 1972; Vesk și Jeffery, 1987). La *Ochromonas danica*, mitoza se desfășoară astfel: în Interfază, corpii bazali ai celor doi flageli se replică, iar plastida se divide printr-o constricție între cei doi lobi ai acesteia. Rizoplastul, atașat la corpul bazal al flagelului lung, se prelungește pe sub aparatul Golgi, până la suprafața nucleului. În Profază se replică dictiozomul și apar două perechi de corpuri flagelare, fiecare cu rizoplastul și aparatul Golgi corespunzătoare. Tot acum are loc o proliferare de microtubuli spre nucleu, unde se generează fusul de diviziune. Concomitent, apar ferestre în membrana nucleară prin care microtubulii formează fusul. O caracteristică la *O. danica* este faptul că rizoplastii formează polii fusului de diviziune, microtubulii inserându-se direct la rizoplasti. O parte dintre microtubuli formează fibre continue, de la un pol la altul, iar alții se prind de cromozomi. Este însă incertă prezența cinetochorilor la cromozomii acestor organisme. Membrana nucleară se rupe în timpul diviziunii cu excepția zonelor nucleare adiacente plastidului și astfel structurile CER rămân intacte.

În Anafaza târzie, cromozomii se dispun în apropierea CER. Această structură va fi înglobată în membrana nucleară a nucleilor fii rezultați, astfel că, în final, fiecare nucleu moștenește câte un CER.

Cromozomii la *Ochromonas* sunt greu de distins, la microscopul optic, pentru că sunt extrem de mici. Aceștia se aliniază în Metafază, formând o placă densă dar detectabilă (Bouck și Brown, 1973). Odată cu începerea Anafazei,cele două seturi de cromozomi se separă spre cei doi poli. Nu există până în prezent date suficiente despre cariotipul acestor organisme.

3. DIATOMEE *(BACILLARIOPHYCEAE)*

Nucleul interfazic al celulei diatomeelor este situat între regiunea polară și regiunea centrală ale frustulei la pennate (Giri și Chaudhary, 1991) sau este situat în straturile parietale ale citoplasmei, la diatomeele centrice (Hoops și Floyd, 1979). Nucleul interfazic are un aspect omogen, fiind lipsit de cromocentrii. Forma nucleului poate să varieze: lenticulară (*Melosira varians*), discoidală (*Rhopalodia gibba*), etc.

Cele mai multe diatomee au un singur nucleol, ce apare târziu în Profază (Eppley și colab.,1967). La alte diatomee (*Gyrosigma kuetzingii; Navicula cuspidata var. ambigua, Hantzschia amphioxys var. denestria*), nucleolul persistă în cea mai mare parte a cariokinezei (Giri, 1992).

Nucleul este mic și crește în volum de 2-4x, în timpul Profazei și migrează în zona centrală a celulei, înainte de începerea mitozei sau se poate deplasa periferic în citoplasmă (*Neidium affine*). Aceste migrări ale nucleului sunt fenomene premergătoare, atât mitozei cât și meiozei.

Holmes (1974) demonstrează prezența a doi nuclei, pentru diatomeea *Lauderia borealis*, iar în timpul diviziunii, fiecare nucleu se deplasează spre centrul celulei, unde se divide. Câte un nucleu fiu, din fiecare pereche, se deplasează adiacent cu valvele vechi, ceilalți nuclei rămânând în zona centrală a celulei.

Diviziunea la diatomeea marină *Detonula confervacea* este influențată de temperatură, lumină și salinitate (Smayda, 1969).

Ciclul nuclear în timpul diviziunii decurge extrem de rapid, astfel, acesta durează 30 secunde, la *Trepsinoe musica* și 210 secunde, la *Biddulphia mobiliensis* (Subrahmanyan, 1945).

Tipul de diviziune la diatomee este o trecere de la mitoza plan-nucleară, la mitoza cu fus intranuclear (Gavrilă,1978). La *Suriella caproni*, diviziunea decurge astfel: centrozomul intranuclear iese din nucleu și se dispune în partea mai lungă a frustulei, fiind înconjurat de raze citoplasmatice. Nucleul devine mai mare și ia forma de cilindru alungit. Nucleolul dispare, iar cromatina se organizează de-a lungul unor filamente cu aspect moniliform, un spirem care, ulterior, se fragmentează în numeroși cromozomi. Centrozomul se divide și din el pornesc fibre fusoriale care formează un fus de diviziune de forma unei sticle de ceas care pătrunde în nucleu. La majoritatea diatomeelor, fusul are un aspect de cilindru (tub). Cromozomii, sub formă de filamente scurte, clivate longitudinal, se dispun la ecuatorul fusului, pe un singur șir. Are loc migrarea spre poli a cromatidelor (cromozomilor-fii),

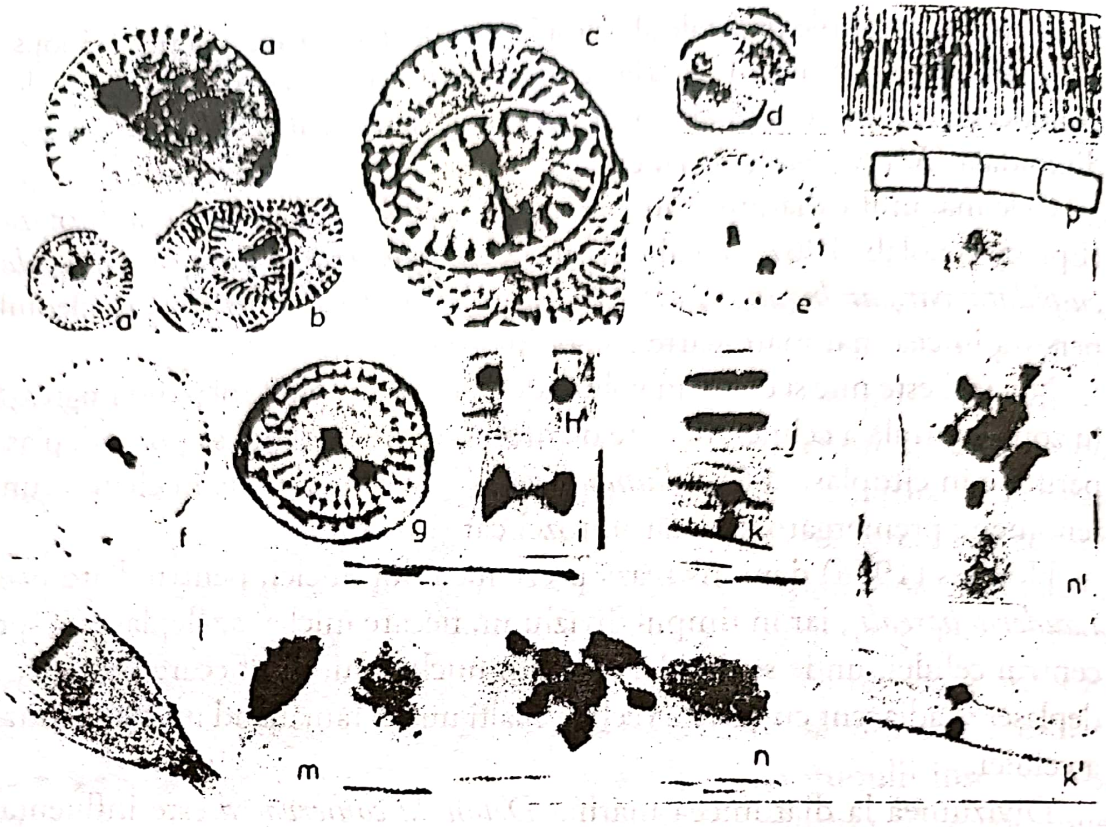


Fig. 14 — Diviziunea nucleară la diatomee centrice (a-h) și pennate (i-p) a-g, *Cyclotella kunzingiana*: a, a', Interfaza; b, debutul diviziunii nucleare; c-g, diferite stadii ale diviziunii nucleului; h, sfârșitul diviziunii la *Melosira varians*; i, Ana-Telofaza, la *Navicula sp.*; j, Telofaza la *Nitzschia stagnalis*; k, k' Ana-telofaza, la *N.dissipata*; l, nucleu în diviziune la *Stauroneis anceps var. fossilis*; m, nucleu profazic; n, n' Metafaza, la *Pinnularia molaris*; o, p colonii de celule rezultate din diviziuni succesive la *Fragillaria intermedia* (o) și *Melosira varians* (p) în care se remarcă faptul că dimensiunea celulelor-fiice este egală (după Gavrilă, 1973; 1978).

care ajungând în nucleii-fii iau formă granulară. Cromatoforii lobați se separă în celulele fiice prin diviziune transversală (când sunt doi) sau longitudinală (când este unul singur).

Gavrilă (1973) consacră un studiu comparativ diviziunii celulare la diatomee, *Centrica*ae și *Pennatae*, constatând o serie de particularități (Fig.14). Modificarea formei nucleului la debutul diviziunii este remarcabilă la *Cyclotella sp.*, la care din forma rotundă interfazică, trece în formă de pană de lemn, apoi în urma alungirii progresive capătă forma de halteră. Este un tip de diviziune mitotică intranucleară. Cromozomii apar mai clar individualizați în Telofază, având formă granulară sau de baghetă scurtă.

Înainte de atingerea configurației metafazice, cromozomii prezintă oscilații monopolare. Polaritatea cromozomilor este determinată în Prometafază, iar bipolaritatea este asigurată în Metafază, după ce tubulii fusului ajung în regiunea nucleară (Hinz et al.,1986). Odată ce cromozomii au atins orientarea bipolară, are loc imediat scurtarea fibrelor cinetocorului.

Oscilațiile cromozomale continuă până când aceștia se aranjează în rozetă în zona ecuatorială a celulei. Acest inel de cromozomi este datorat microtubulilor, cu dispunerea lor radială în jurul nucleului și care imprimă o mișcare radială cromozomilor la ecuator (Wordeman și colab.,1986).

Organizarea cromozomilor într-un inel ecuatorial este considerată mai mult o caracteristică mai apropiată de celula animală, decât de plante.

Diviziunea nucleului este rapid urmată de citokineză, în mitoză, pe când în meioză, citokineza începe după ce nucleii supranumerari devin picnotici (Hops și Floyd, 1979).

O caracteristică a diviziunii la diatomee este reducerea graduală a diametrului celulei pentru fiecare nouă generație. Acest fenomen a fost descris, încă în anul 1869, și reiterat odată cu recunoașterea rolului epitecii și hipotecii în diminuarea dimensiunii celulei (Mazia, 1961). Diametrul celulei inițiale este refăcut, prin procesul de auxosporulație (Round,1972).

Ciclul de viață al diatomeelor este monogametic diploid, cu gametofit diploid și gameți meiotici (Heywood și Magee,1976). Spermatogeneza poate fi indusă prin variații de intensitate luminoasă sau de temperatură (ex. *Coscinodiscus asteronephalus*) sau prin creșterea conținutului de Na^+ în mediu (ex. *Cyclotella cryptica*).

Un studiu amănunțit de microscopie electronică a fost efectuat de Manton și colab. (1969, 1970) atât asupra mitozei cât și asupra meiozei, la diatomeea centrică *Lithodesmium undulatum*. În Profaza I, în apropierea membranei nucleare, se formează un fus extranuclear care se alungește și pătrunde în nucleu, pe măsură ce membrana nucleară se fragmentează. Numărul de micotubuli este mai mare în meioză, decât în mitoză. Membrana nucleară se fragmentează în Profaza ambelor diviziuni meiotice și se reface în Telofază, începând la partea polară a fiecărei grupe de cromozomi–fii. În secțiuni longitudinale prin nuclei metafazici apare un fus central intranuclear, ce se întinde de la un pol la celalalt, 10% dintre microtubulii săi fiind continui, iar restul dispuși între pol și ecuator. Deși există contact între cromozomi și fibrile fusoriale, la această diatomee nu s-au remarcat cinetocori deși microscopia optică indicase prezența lor. Produșii meiotici sunt gameți flagelați. Prima diviziune meiotică durează 4-5ore. A doua diviziune completează spermatogeneza. Meioza II se termină în mai puțin de 3 minute. Formarea *de novo* a centriolilor în Interchineză poate indica faptul că aceste organite sunt activ implicate în meioza II, de vreme ce ele ar putea fi formate după terminarea meiozei.

Cromozomii apar sub formă de baghete mai mult său mai puțin alungite, cu dimensiuni cuprinse între 0.25-1.75µm. Iyengar și Subrahmanyan (1944) pun în evidență la *Cyclotella meneghiniana* cromozomi lungi, ce adoptă forme de tip: V, J, I și care pot prezenta regiuni centromerice, generând cromozomi metacentrici, submetracentrici și acrocentrici. Spurck și colab. (1986) infirmă prezența centromerilor prin studiile efectuate la mai multe specii de *Pinnularia.*

Cercetările de ultrastructură asupra regiunilor centromerice ale cromozomilor și cinetocorilor la *Diatoma vulgare, Melosira varians* și *Suriella ovalis* au arătat prezența a mai mult de un cinetocor funcțional și s-a demonstrat că dacă un cinetocor al unui cromozom metafazic a fost inactivat cu microunde, acel cromozom se va mișca cu fața spre cinetocorul neiradiat.

La *Cyclotella kutzingiana* se întâlnesc 15 cromozomi, la *Achnanthes inflata* au fost identificați 6 sau 8 cromozomi, iar la *C. meneghiniana* 32 sau 34. Cel mai mare număr de cromozomi a fost raportat la *Rhopalodia gibba* (2n=64), iar cel mai mic, la *Nitzschia pseudofonticola* Hust (2n=6). Giri (1989), pe baza studiilor sale efectuate pe 40 de taxoni, împarte diatomeele în 3 tipuri, după numărul de cromozomi (x=3, 4, 5). Acest studiu este însă departe de posibilitatea de a avansa unele ipoteze privind rolul ploidiei în speciația acestor organisme.

CAPITOLUL XXIX

GENOMUL ALGELOR BRUNE *(PHAEOPHYTA)*

Algele brune (*Phaeophyta*) au o organizare eucariotă tipică, cu mitoza și meioza tipice și cu nuclei de dimensiune mică sau foarte mică, cu mai mulți nucleoli.

Dimensiunile nucleilor sunt cuprinse între 3-11µm și au o structură granulos reticulată cu 1-2 nucleoli (Ex.: *Halidris siliquosa, Cystoseira tamariscifolia*). În anteridii și oogoane nucleii interfazici prezintă un diametru de 13µm, datorită stării polienergide (ulterior se restabilește statutul uninucleat). La *Zonaria sp*, nucleul interfazic din celulele vegetative este mai mare, comparativ cu nucleii din alte tipuri de celule (Neushal și Dahl -1972) și prezintă o formă bilobată, neregulată.

Ca și la *Chrysophyceae*, nucleii unor alge brune pot prezenta structuri de legătură între membrana nucleară externă și cisterna externă (aparținând RE) a feoplastului (structuri CER), la câteva ordine (*Dictyotales,Laminariales* și *Fucales*) existența acesteia nefiind demonstrată (Dragoș și colab.,1997).

Se consideră că membrana nucleară este persistentă, iar fusul de diviziune este intranuclear. Separarea celor 2 nuclei se realizează prin constricția ecuatorială a membranei nucleare (Roberts, 1966).

Meioza este tipică și are loc odată cu formarea anteridiilor și oogoanelor (mai precis la prima diviziune a nucleului inițial al gametangelui - talul fiind 2n). În anteridii și oogoane are loc o multiplicare de până la 32-64 nuclei, ulterior printr-o perfectă sincronizare aceste celule suferă o reducere a numărului de nuclei (în urma a 3 diviziuni succesive) până la 8 nuclei pe oogon. Din acești 8 nuclei, 7 vor avorta (randomizat), rezultând în final 1nucleu/oogon (Moss și Elliot, 1957).

A doua diviziune meiotică urmează imediat celei reducționale în sporangele uniloculat. Rezultatul final al celor două diviziuni meiotice este un oogon cu 4 nuclei n (tetradă).

La feoficeele *Chorda tomentosa* și *Pylaiella littoralis*, în nucleii aflați în Profaza meiotică, în sporangele unilocular, s-au evidențiat complexe sinaptonemale ale căror dimensiuni sunt caracteristice fiecărei specii.

Mitoza este tipică: în Profază, cromozomii sunt ca niște filamente a căror cromoneme suferă condensări și spiralizari ulterioare (în Metafază). În Metafază, cromozomii ating 0.5-0.8μm, rar 1.2μm lungime. În cursul meiozei apar bivalenți ce prezintă chiasme terminale și interstițiale.

Centrozomii au un rol activ, iar nucleul prezintă ferestre polare prin care microtubulii fusului pătrund în nucleu.

Cromozomii la feoficee sunt reprezentați de autozomi și heterozomi (mai mari decât primii). La *Laminaria sp ,Saccorhiza, Alaria sp., Chorda sp.* din complementul de cromozomi (cca 30) a fost descris un heterozom de dimensiune mare ce este absent în gametofitul mascul și care este implicat în determinismul cromozomal al sexului, la aceste alge (Evans, 1963) Ulterior, a fost descoperit în gametofitul mascul un cromozom de mici dimensiuni, considerat heterozom Y. Heterozomii X și Y se împerechează în timpul meiozei (în sporange), fiind omologi, dar heteromorfi..

Feoficeele sunt primele alge la care s-a evidențiat determinism sexual de tip X/Y, iar la *Chorda sp.* și *Desmarestia* au fost descriși hermafrodiți.

Variația numărului de cromozomi se realizează prin aneuploidie și poliploidie și prin posibilitatea apariției pe cale naturală a unor hibrizi intraspecifici viabili (de pildă între specii de *Laminaria*)

CAPITOLUL XXX

GENOMUL ALGELOR ROȘII *(RHODOPHYTA)*

Rodoficeele au o organizare eucariotă tipică, cu meioza si mitoza tipice, prezentând însă un aparat fusorial primitiv.

Numărul, forma și dimensiunile nucleilor la rodoficee reprezintă caractere variabile. La *Bangiophyceae,* majoritatea celulelor sunt uninucleate, iar la *Florideophyceae* se întâlnesc atât celule uninucleate cât și celule multinucleate (polienergide). La *Griffithia globulifera*, în celulele bătrâne se pot întâlni între 12-75 nuclei, uneori chiar mai mulți (cca.100). Starea polienergidă se datorează cel mai frecvent unei nesincronizări între mitoza și separarea celulelor fiice.

Dimensiunile nucleilor sunt mici, cca. 3µm la *Gigartina sp.* Cei mai mari sunt întâlniți la *Ceramiales.* De obicei, nucleii de mari dimensiuni sunt endopoliploizi (Wu, 1996).

O caracteristică a algelor roșii este aceea că își folosesc organitele pentru separarea nucleilor fii. Înaintea citokinezei, un rodoplast sau o vacuolă se intercalează între nucleii fii în formare și conduce la dezorganizarea locală a fusului de diviziune (Schornstein și Scott, 1982). La câteva specii, în celulele multinucleate, membrana nucleară nu se dezorganizează în timpul cariokinezei și se pare că asigură o separare eficientă a nucleului în diviziune față de restul celulei (Phillips și Scott, 1981).

Un caz de mitoză anormală a fost semnalat la *Porphyridium purpureum* la care membrana nucleară persistă în Metafază, dar prezintă ferestre ovale. Microtubulii nucleari se asociază fusului, iar cromozomii nu sunt codensați (Fig.15).

Într-o mitoză obișnuită a rodoficeelor membrana nucleară și nucleolul dispar.

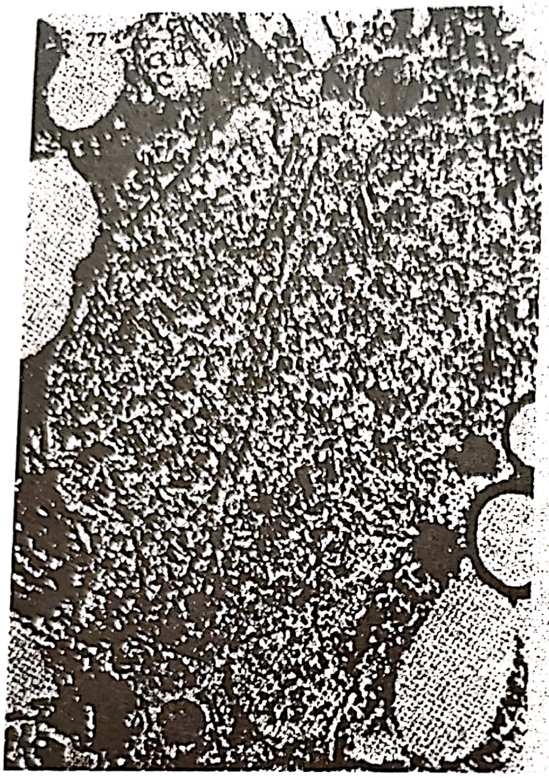


Fig. 15 — Metafaza la *Porphyridium purpureum* în care se remarcă prezența membranei nucleare intacte cu excepția ferestrelor polare, microtubuli intranucleari ce se termină în zone sărace în ribozomi delimitate de fragmente de reticul endplasmic și microcorpi (după Bronchart și Demoulin, 1977, din Gavrilă, 1978; X 16750).

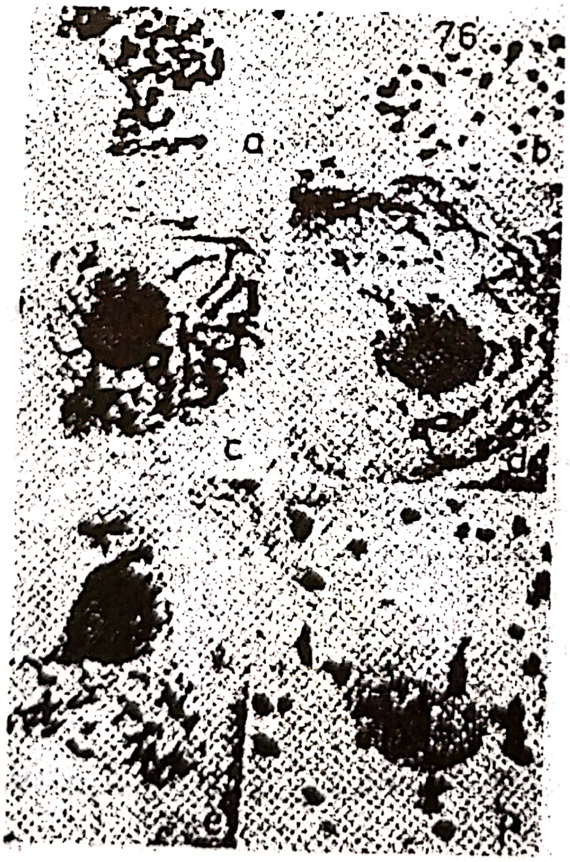


Fig. 16. Faze ale diviziunii mitotice (a, b) și meiotice (c-f) la *Furcellaria fastigiata (Rhodophyta)* (după Dixon, 1966, din Gavrilă, 1978) a, Profaza târzie, într-o celulă diploidă (2n=68) corticală a tetrasporofitului; b, Profaza târzie, într-o celulă haploidă (n=34) corticală a gametofitului; c, Zigoten timpuriu, din Profaza meiotică, în tetrasporange; e, Diploten târziu; f, Diachineza în nucleul tetrasporangelui.

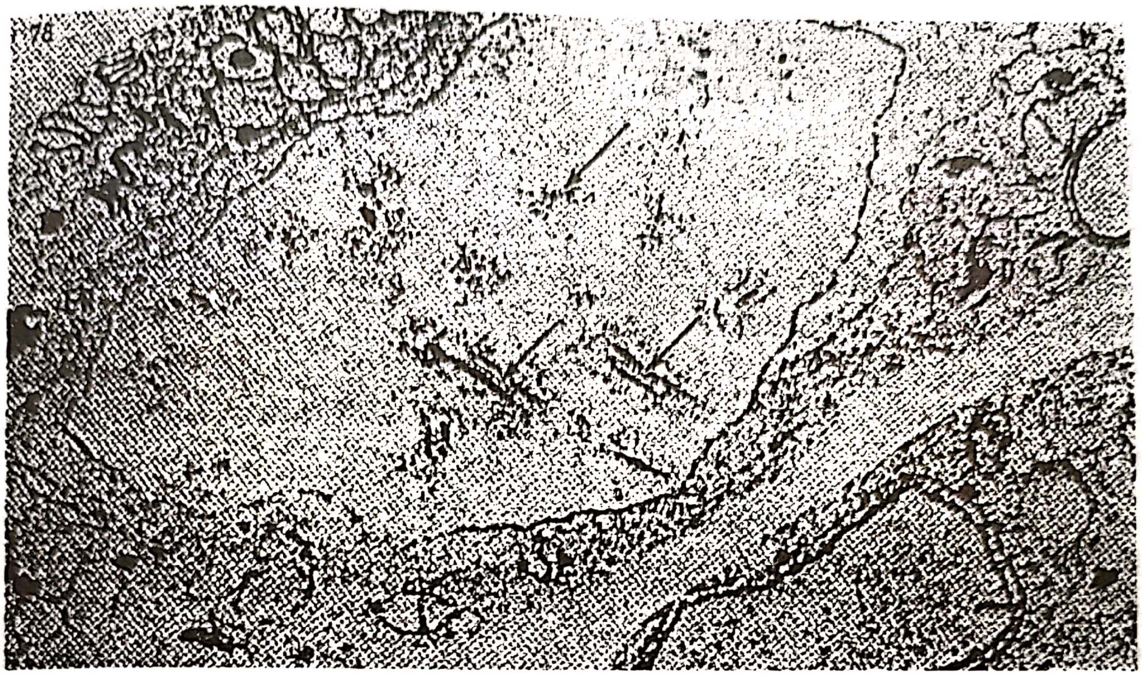


Fig. 17 — Complexe sinaptonemale (săgeți), în nucleul celulei mame-tetrasporale, de la alga roșie *Janezewskaia gardneri* (după Kugrens și West, 1972, din Gavrilă, 1978; X 18000).

În cazul algei roșii *Membranoptera*, între polii nucleului profazic apare un inel unic cu dispunere polară și funcție necunoscută.

Meioza este tipică, împerecherea bivalenților (între care se stabilesc mai multe chiasme) începe în Zigoten și se continuă în Pachiten, dispunerea bivalenților realizându-se în cruce sau inel.

În nucleul celulei mame tetrasporale la alga *Janezewskaia gardneri* (fig.17) s-au pus în evidență electronomicroscopic, complexe sinaptonemale (Kurgrens și West, 1972). Cromozomii sunt sferici, ovali sau alungiți (Fig.16), cu centromeri mediani sau submediani iar placa metafazică este compactă. Bivalenții au o formă globulară în Diachineză. În Metafază aceștia se dispun la ecuator, iar separarea anafazică este rapidă. La *Polysiphonia violacea* nu există interchineză, cromozomii trecând direct în metafaza homeotipică. Când are loc sinteza de ADN, fără să fie urmată de kariochineză, se pot forma celule cu seturi de cromozomi suplimentari (poliploidie) sau conținând cromozomi politeni. (Wu ,1996)

Cromozomii de mari dimensiuni implicați în formarea inelului de translocație au fost considerați heterozomi.

Numărul de cromozomi este variabil, în limite largi n=2/4 (*Porphyra linearis*) sau 2n= 61-62 (*Chondria dasyphylla*), fiind o consecință a stării polienergide a celulelor, dar și o consecință a unor aneuploidii sau poliploidii. La genurile *Ceramium, Laurencia* și *Polysiphonia,* hibridările și poliploidia sunt principalele căi de evoluție (Cole, 1990)

Descifrarea mecanismelor de segregare mendeliană sau non-mendeliană a unor caractere ce sporesc calitatea și cantitatea unor rodoficee de interes industrial (dispunerea ramurilor, fertilitate etc.) au fost impulsionate de experimentele de obținere a unor hibrizi intra-/interspecifici la *Gigartinale* (Polanshek, 1974)

O altă descoperire importantă în acest sens a constituit-o mutațiile pigmentare (verzi) produse prin folosirea agentului mutagen N-metil N'-nitro-Nitrozo Guanidina (NNG) asupra unor taluri de *Porphyra sp.* (Mitman, 1987) și *Gracilaria tikvahiae*, *Palmaria palmata*, *Gelidium sp*, *Porphyra yezoensis* (van der Meer, 1987) sau prin mutație spontană la *Porphyra yezoensis* (Miura 1977; Aruga și colab., 1984) Toate aceste experimente au permis elucidarea fenomenelor de fertilizare, în cazul unor specii monoice sau dioice, separarea și identificarea pe baza acestor markeri genetici a produșilor rezultați din procese sexuate sau asexuate.

CAPITOLUL XXXI

STUDII RECENTE ASUPRA ADN ȘI APARATULUI GENETIC LA UNELE GRUPE MAJORE DE ALGE

1. ADN LA CLOROFITE

ADN la cloroficee, inclusiv la *Chlamydomonas* (unde s-au acumulat cele mai multe date) se prezintă sub forma de fibre împachetate cu histone formând nucleosomi (Woodcoock și colab.,1977) de cca. 70-75 Å diametru. Fibra de ADN fiind de 440-640 Å în lungime (înfășurată pe nucleosom) iar fibra de ADN linker este de cca.200 Å.

În cazul algei *Chlamydomonas* s-a pus în evidență mai multe categorii de ADN (Chiang și colab.,1967). Astfel, *Chlamydomonas*, ca și toate celelalte alge unicelulare și pluricelulare reprezintă sisteme multigenomice, având trei genomuri celulare în compunere:

-unul nuclear fracția α, de $1.723 g/cm^3$, reprezentând cca. 85% din ADNtotal;

-unul plastidial, ADNcp sau fracția β, cu $1,695 g/cm^3$, respectiv 14% din ADNtotal;

- unul mitocondrial, ADNmt, cu $\sigma = 1.712 g/cm^3$, Amplificarea genelor nucleare pentru ARNr stă la baza fracției de ADN celular γ care are densitatea de $1,715 g/cm^3$.

ADNnuclear. Cantitatea de ADN nuclear prezintă o constantă de sedimentare de 11S. La *Chlamydomonas*, cantitatea ADN /celula /18 cromozomi este de 1.2×10^8 Da, iar pe un cromozom de cca. .8.0×10^6 Da. Replicarea ADN nuclear are loc o singură dată, în intervalul cuprins între unirea gameților și germinarea zigotului. Se admite că replicarea meiotică a ADN se realizează după desăvârșirea crossing-over-ului sinaptic sau cele două fenomene sunt coincidente. Rezultă că prima diviziune meiotică este precedată de o singură replicare a ADN (Gavrilă, 1978). Replicarea ADNnuclear are loc la întuneric și cu 12 ore mai târziu, față de replicarea ADNcp. Baltimore și colaboratorii (1974) au constatat că inhibitorii ADN nuclear sunt neomicina, streptomicina, spectinomicina, cleocina, cloramfenicolul, rifampicina, acestea afectând doar sinteza ADNnuclear, ADNcp nefiind afectat.

ADN fracția g reprezintă de fapt genele pentru ARNr citoplasmatic, amplificate, cu localizare la nivelul NOR. Date mai recente clasifică ADNtotal de la *Ch. reinhardtii* în funcție de densitate și conținut de bază A+T și C+G astfel:

1)ADN nuclear cu A+T =36-38%; C+G=62-64% și ρ = 1,726 g / cm^3:

2)ADN-cloroplastic (ADNcp) cu A+T=61-65%; C+G=35-39% :

3)ADNmitocondrial (ADNmt) și ADNcp prezintă de obicei o densitate mai mare decât ADNnuclear. Raportul de baze complementare A+T/C+G=1 fapt ce demonstrează natura bicatenară a ADNcp și ADNmt. Posibilitatea obținerii hibrizilor ADNnuclear:ADNmt sau ADNcp este redusă.

ADNmt a fost pus în evidență electronomicroscopic (Nass și Nass, 1963), fiind alcătuit din molecule circulare. Zonele bogate în ADNmt se prezintă cu forme globuloase sau rețele de fibre, cu lungimi de 3-20μm, la algele verzi, *Ch. reinhardtii, Monostroma nitidum, Nitella sp.* (Yokomura, 1967). Replicarea ADNmt este semiconservativă de tip special, cu bucla de îndepărtare-bucla D, existând o ADN polimerază mitocondrială specifică. La nivel mitocondrial a fost evidențiat un sistem propriu de transcriere-traducere a informației codificate în ADNmt, cu independență relativă față de nucleu (Borst și colab.1969).

La alga clorofită *Polytoma obtusum,* asemănătoare lui *Chlamydomonas,* (dar care este incoloră deoarece prezintă leucoplast și nu cloroplast) au fost determinate următoarele tipuri de ADN (după Sin și colab .1976):

1)ADNnuclear cu A+T=35% : C+G=65% și ρ=1.711g/ml

2)ADNplastidial sub formă de bandă satelitică cu ρ =1.682g/ml

3)ADNmt cu ρ=1.714g/ml

Genele pentru ARNr sunt organizate într-un singur cistron, în genomul cloroplastic.

2. ADN LA VOLVOCALES

La *Astrepomene gubernaculifera,* Brooks și Nasatir (1966) evidențiază un conținut de C+G=61-62%. La acest ADN peak-urile de absorbție nu sunt la 260nm, ci la 257nm, temperatura de denaturare fiind de 95^0C, iar $\rho=1.720g/cm^3$. În cazul lui *Volvox carteri,* au fost găsite următoarele specii de ADN: ADNnuclear, cca. 80% din total, cu $\rho=1.715g/cm^3$; ADNcp, cu $\rho=1.707g/cm^3$ și ADNmt. Sinteza ADN și ARN, la *Volvox aureus* este minimă, la 12 ore de la începerea ciclului celular, și maximă, după 36-48ore. Mitomicina C (45µg/ml) inhibă sinteza ADN, iar Actinomicina D (4µg/ml) inhibă selectiv sinteza ARN. Sinteza ADN și ARN nu are loc la întuneric.

3. ADN LA PROTOCOCCALES

La *Chlorella ellipsoidea*, genomul a fost estimat a avea 8x 10^{7} pb/celulă/set haploid, din care:

ADNnuclear cu A+T=43%; C+G=57% și $\rho=1.716g/cm3$ și reprezintă 2,94 x10^{10} Da din genom

ADNcp cu A+T=64%; C+G=36% cu $\rho=1.695$ și reprezintă 2.1x10^{10} Da din genom.

Experimentele de cinetică de renaturare a ADN la *Chlorella pyrenoidosa* au arătat existența a 3 clase de ADN:

-a) cu renaturare rapidă, cca.5% din genom;

-b)cu renaturare intermediară, cca.15% din genom ;

-c)cu renaturare înaltă, cca. 80% din genom.

Clasele a+b sunt reprezentate de elementele repetitive, constituind cca.20% din genom (amplificarea genică este un fenomen curent la *Chlorella*) iar clasa c este reprezentată de secvențe unice.

În cazul ADNnuclear, compoziția C+G variază de la o specie la alta (Nagl, 1977) ADNnuclear la *Chlorella* conține secvențe lungi, bogate în Citozină. În afara bazelor A, T, C și G se întâlnesc în cantități reduse Acidul pseudouridilic și Acidul pseudocitidilic. ADNnuclear la *Chlorella* conține cca. 3,5% moli de 5-acetil citozină, ADNcp nu posedă această bază (Bayen și colab.,1973).

Cantitatea de ADN și ARN crește odată cu adăugarea de sulfuri libere în mediu (Iwanura,1962).

4. ADN- LA SIPHONALES /SIPHONOCLADALES

ADN nuclear a fost studiat în cistroni activi pentru precursorii ARNr. Astfel, în nucleul de *Batophora oerstedii* s-au evidențiat cistronii pentru ARNr, constatându-se absența elementelor de spațiere în structura acestor gene. Au fost evidențiate însă și regiuni ce sunt transcrise și conțin elemente de spațiere (Berger și colab.,1975).

ADNcp a fost reperat de Baltus și Brachet (1963) la *Acetabularia mediterranea* și *Polyphysa cliftoni*, ulterior fotografiat și izolat.

5. ORDINUL VOLVOCALES

Ordinul Volvocales cuprinde alge verzi flagelate, coloniale, cu unități celulare tip *Chlamydomonas*. Reprezentantul ordinului este *Pandorina morum*.

În Interfază, nucleul apare sferic. La *Dunaliella salina*, nucleul are un diametru de cca. 4µm, cu materialul genetic condensat sub formă de heterocromatină periferică, iar în centru se observă, de regulă,un nucleol (fig.1). În Profaza se individualizează granulele de cromatină ,cromozomii apărând baghetiformi, cu cromatidele sub formă de filamente spiralate.

Migrarea spre polii fusului este asincronă, rezultând adesea cromozomi retardanți. În Anafază, cromozomii capătă un aspect mai difuz. Inițial are loc o sinteză de ADN (faza lungă de S), după care începe diviziunea mitotică. Așa se explică faptul că la *Pandorina*, dintr-o celulă, prin mitoze succesive, în numai 10 min, se formează o colonie (8,16,32 celule). Lumina inhibă mitoza, celulele putând ajunge poliploide. Înlăturarea condițiilor nefavorabile pentru mitoză accelerează mecanisme (încă neelucidate) prin care celula revine la starea haploidă inițială.

În cazul *Pandorina morum* se evidențiază o mitoză tipică (Gavrilă, 1973) alcătuirea cromozomilor si aspectul acestora fiind de tip „plantă superioară" (Godward,1966). În Metafaza, cromozomii dispuși în placa metafazică sunt

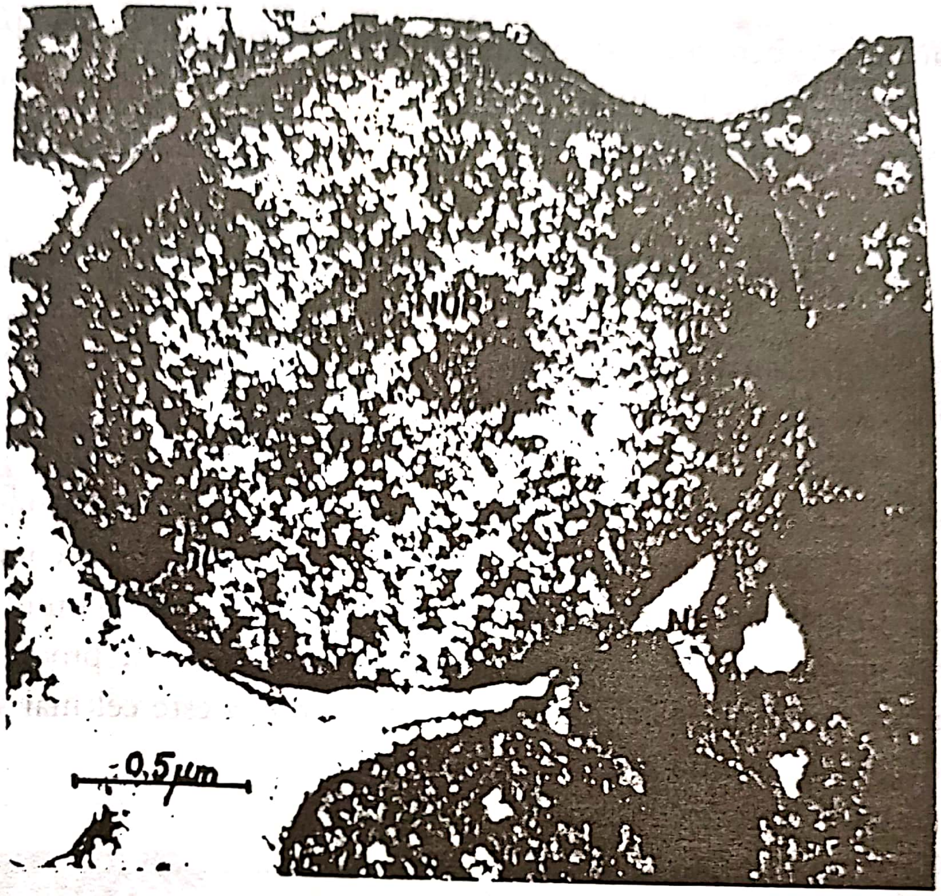


Fig. 1 — Ultrastructura nucleului la *Dunaliella salina (Volvocales)* se disting blocuri de heterocromatină periferică (ht), o membrană nucleară dublă (NE) și două regiuni NOR. (original)

înghesuiți și adoptă forme de baghetă, de V , iar unii, posedă sateliți. Centromerii au dispunere mediană sau submediană, cu constricții secundare și sateliți. Numărul de cromozomi este n=10 (fig.2). În timpul mitozelor succesive, cromozomii scad ca dimensiune, aproape la jumătate, conducând la ipoteza existenței unor cromozomi politeni, în stadiul inițial (asemănători celor de la *Protococcales-Chlorella*) ce ulterior (prin mitoze succesive) pierd această proprietate. Concentrații de 1% de colchicină pot genera poliploizi și celule polienergide așa cum a evidențiat Sarma (1976), la *Gonium pectorale*.

Variația numărului de cromozomi este relativ redusă (Godward,1959)

Odată cu formarea coloniilor la *Pandorina morum*, s-au evidențiat diviziuni ce conduc la apariția de celule aneuploide (Gavrila, 1973). La *Astrephomone gubernaculifera* există tulpini cu 4, 6, 7, 8 cromozomi, tulpinile cu 6 și 8 cromozomi derivă dintr-o sușă comună, cu 7 cromozomi, printr-un mecanism de rupere și nondisjuncție , în cursul mitozei (Cave si Pocock, 1956). În general, hibrizii interspecifici conduc la descendenți poliploizi sau aneuploizi neviabili (ex. *Eudorina elegans x E.illinoisensis*).

6. ASPECTE GENETICE ÎN ORDINUL CHLOROCOCCALES

Există două modele binecunoscute de clorococcale: *Chlorella vulgaris* și *Scenedesmus quadricauda*

Modelul „*Chlorella*" - Lipsită de un proces sexuat și cu un ciclu haploid, fără mecanisme de neutralizare a mutațiilor și de realizare a recombinării genetice, *Chlorella* are o variabilitate genotipică scăzută, acumulând cu ușurință mutații. Acestea pot fi eliminate numai datorită unui proces extrem de rapid de diviziune. Ciclul celular de la *Chlorella* este cel mai simplu, întâlnit la algele eucariote și cuprinde 4 faze:

1) Cresterea activă a volumului celular
2) Maturarea timpurie,
3) Maturare târzie,
4) Diviziunea și de eliberarea sporilor numiți și *auxospori*, deoarece reprezintă celule identice cu celula mamă. Fenomenul de *auxsporulațiune* la alga *Chlorella* a fost descoperit de marele botanist român Ioan Grințescu, pe când lucra în laboratoarele din Elveția, în anii '30 ai secolului al XX-lea.

ADN se replică de 4 ori (16x față de volumul initial de ADN).

La *Chlorella pyrenoidosa* s-a constatat existența unui fus de diviziune tipic, nucleolul dispare în timpul diviziunii, membrana nucleară este dublă și prezintă ferestre polare.Unele tulpini sunt lipsite de centrioli. În cazul când există, aceștia se replică în Profaza, formând polii fusului de diviziune. Clivajul celular este realizat printr-un ficoplast (fragmoplast).

La genul *Chlorella* nucleul apare sferic - oval, de obicei cu dispunere centrală, în Interfază el având un diametru de 1.8µm, iar în Profază de 2,5 µm. Nucleolul este de mici dimensiuni – 0.6µm. Cromozomii sunt foarte mici (Fig.3), în Prometafază, cu dimensiuni cuprinse între 0.3-0.8µm, au formă sferică sau sunt ușor alungiți. Inițial, numărul de cromozomi raportat pentru acest gen a fost de n=14-15 (Peshkov și Rodionous, 1964, dar date

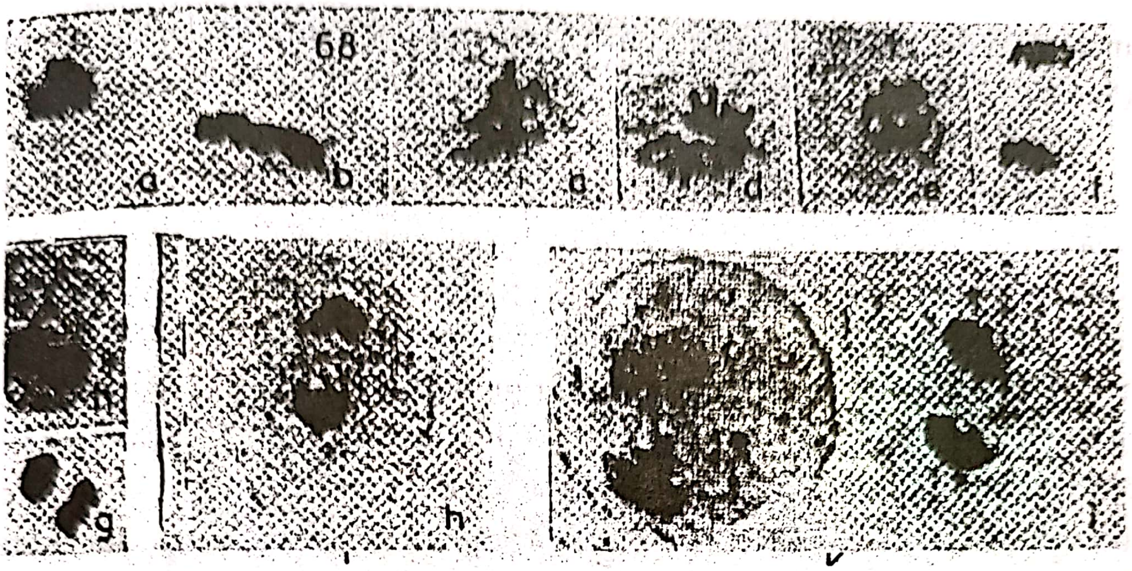


Fig. 2 — Diviziunea nucleară la *Pandorina morum*: a, nucleu profazic, b, placa metafazică cu cromozomi strâns aliniați; c, d, Metafaze în vedere polară; e, f, Ana-Telofaze; g, i, j, k, Telofaza; h, Interfaza (după Gavilă, 1978).

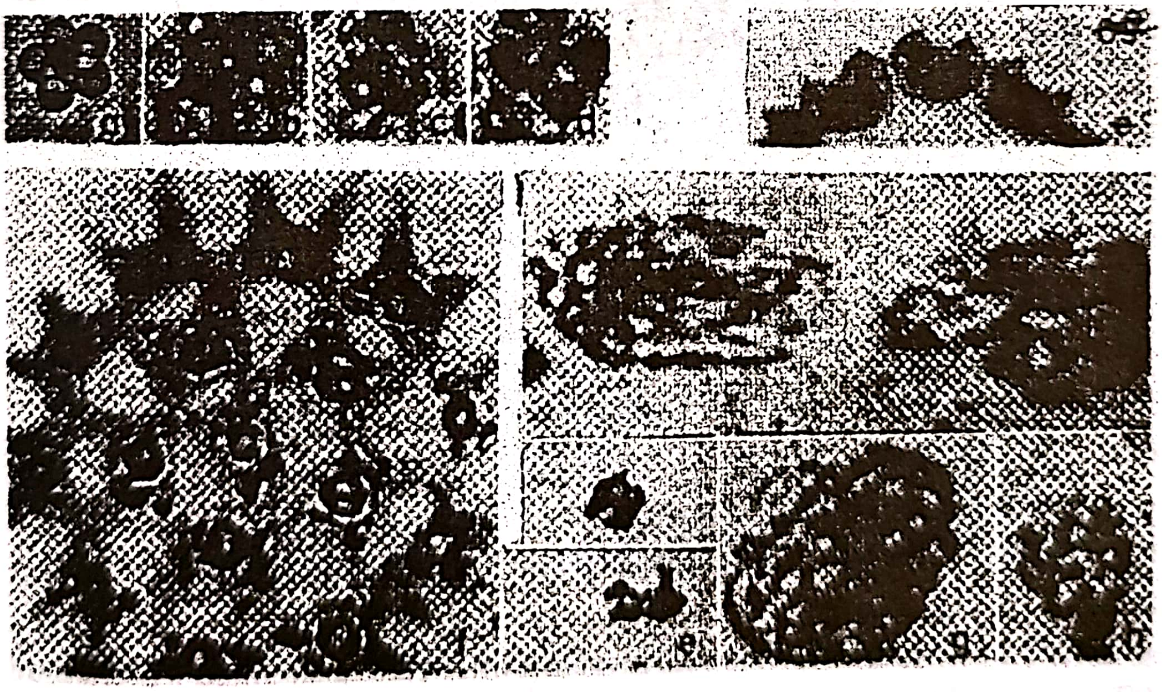


Fig. 3 — Auxosporulația la *Chlorella vurlgaris* (a-d) și la *Pediastrum* (e, e', f) și cromozomii la *Oedogonium* (g-i); e, nuclei multipli, la *Pediastrum constrictum;* f, nuclei multipli (auxosporulație) în cadrul cenobiului de *Pediastrum duplex var. clathratum*; g-i, *Oedogonium glabrum*:g, Profaza, h, Metafaza, i, Anafaza.(după Gavrilă, 1978).

mai noi demonstrează existența a n=10 cromozomi pentru *Chlorella vulgaris* (Sarda, 1989). La *Chlorella*, cromozomii sunt temporar politeni.

Modelul „*Scenedesmus*" - *Scenedesmus* posedă o celulă tipic eucariotă, ca organizare și funcționare. Alga formează de obicei cenobii de câte 4 celule (Das, 1973), diviziunea este o mitoză tipică (Sulek, 1972). Nucleul este dispus central, având o membrană dublă și nu prezintă cromocentrii în Interfază. Nucleolul este mic și amplasat central, cu cromatina concentată neregulat, uneori la zona de contact cu membrana nucleară. În Interfaza, centriolii se află într-un infundibul al membranei nucleare. Profaza găsește centriolii în replicare și ulterior aceștia se separă, menținându-se legați prin intermediul fibrelor cromatice intercromozomale. În Profază, nucleul crește de 2x în volum. Cromozomii metafazici apar ca niște puncte mai mult sau mai puțin alungite, de mici dimensiuni 0.3-0.8μm. Numărul de cromozomi la *Scenedesmus quadricauda* este de n=12 (Sulek, 1969). Cel mai mare număr de cromozomi raportați pentru *S. quadricauda var. quadricauda* a fost n=14, iar numărul minim (n=4) a fost întâlnit la *S. arcuatus.* Variația numărului de cromozomi se datorează fenomenelor de cuplare a euploidiei cu aneuploidia, fapt ce asigură speciația în populațiile de *Scenedesmus*.

7. ORDINUL ULOTRICHALES

Acest ordin grupează alge polimorfe, cele mai des întâlnite fiind genurile: *Ulothrix, Uronema, Enteromorpha, Ulva, Monostroma* etc. La toate acestea, mecanismul de diviziune îl constituie mitoza tipică. Nucleul este de obicei central și unic. La *Enteromorpha intestinalis,* nucleul are 3-3,5 μm și prezintă un singur nucleol, ușor excentric, de 1-1,5 μm diametru, blocuri de heterocromatină reduse și dispuse periferic (fig. 4) (Vladimirescu și colab., 2003).

Meioza conduce la formare de bivalenți între care se stabilesc 1-3 chiasme (Godward, 1966). Complexele sinaptonemale au cca. 30μm lățime. La *Ulva mutabilis* au fost descrise complexe sinaptonemale lipsite aparent de elementul central (Braten și Nordby, 1973). Fusul de diviziune este deschis la *Ulva* (Lovlie și Braten, 1968, 1970).

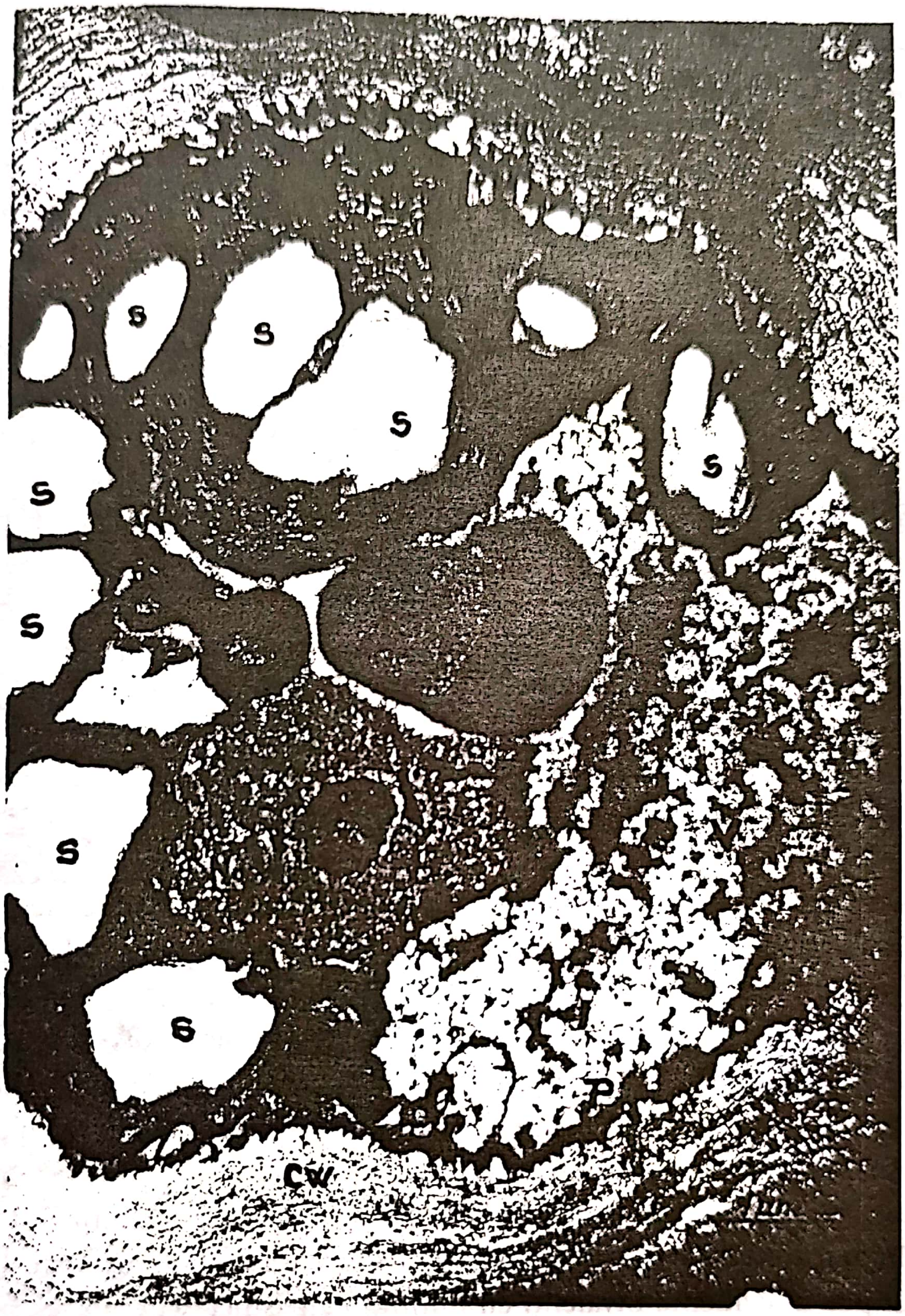


Fig. 4 — Ultrastructura unei celule de *Enteromorpha intestinalis (Ulotrichales)*, se observă nucleul (N) poziționat între o vacuolă de mari dimensiuni (V) și cromatoforul bogat în depozite de amidon (S) și lamele tilacoidale (Tl). Nucleul prezintă un nucleol în vecinătatea căruia se află un cromozom organizator nucleolar. Heterocromatina este puțină și cu dispunere periferică. Se mai observă un perete celular gros (CW), plasmalema (P) și incluziuni de natură lipidică (L). (original)

Cromozomii sunt mici, între 0.25-2μm lungime, punctiformi, ușor alungiți, la unele specii întâlnindu-se și cromozomi mai mari (de obicei 1-2) cu dispunere la periferia plăcii metafazice. Cromozomul organizator nucleolar a fost descris la *Sphaeroplea annulina* (Sharma, 1962). La mutanta **„slender”** de la *Ulva mutabilis* (n=8), are loc o distribuție randomizată a cromozomilor, în celulele fiice și astfel rezultă zoospori cu viabilitate redusă. Poliploidia este generată pe cale naturală (la genurile *Microspora si Hormidium*) aceasta poate însă fi indusă la *Sphaeroplea annulina* și *Microspora loefgrenii* (Sarma, 1962).

Aneuploidia este cel mai important fenomen în evoluția și speciația acestui ordin. Se întâlnesc rase cromozomiale (serii roberstoniene) la *Microspora amoena*, *Ulva lactuca, Enteromorpha sp. (E.compressa „A”* n=10; *E. compressa*„B” n=9; *E.compressa var ligulata* n= 10, 20; *E.intermedia* n= 10, 12, 16, 24, 26).

La *Ulva* s-au pus în evidență mutante naturale, autozomale recesive: *globosa* (*gl*), *ramificata (br), precoce (pre)* (Foyn, 1961, 1962).

8. ORDINUL OEDOGONIALES

Acest ordin, cuprinde alge verzi ce prezintă fenomene unice legate de diviziune și de îngrosările în caschete (Pickett-Heaps, 1971). Genul *Oedogonium* prezintă un nucleu interfazic elipsoid, cu un nucleol mare și numeroase filamente sinuoase sau spiralate, ce reprezintă fibre de cromatină.

În Metafază, cromozomii din placa ecuatorială sunt dedublați. Nucleolul se dezintegrează la sfârșitul Metafazei, în vecinatatea lui apărând fibre ce pot fi zone organizator nucleolare. Fusul de diviziune este intranuclear, iar cinetochorii sunt complecși, polistratificați (6-7 straturi) (Fig.5).

Meioza a fost bine studiată la *Oedogonium faveolatum* (Hoffman, 1965) și s-au pus în evidență bivalenți cu minim 5 chiasme.

La genul *Oedogonium* cromozomii sunt submetacentrici, metacentrici și acrocentrici. (Godward, 1966), unii dintre aceștia prezentând sateliți și constricții secundare.

La *Oedogonium glabrum*, cromozomii profazici au aspect moniliform și sunt foarte lungi, iar desfașurarea Metafazei este foarte asemănătoare cu aceea de la plantele superioare. În celula vegetativă a acestei alge s-au

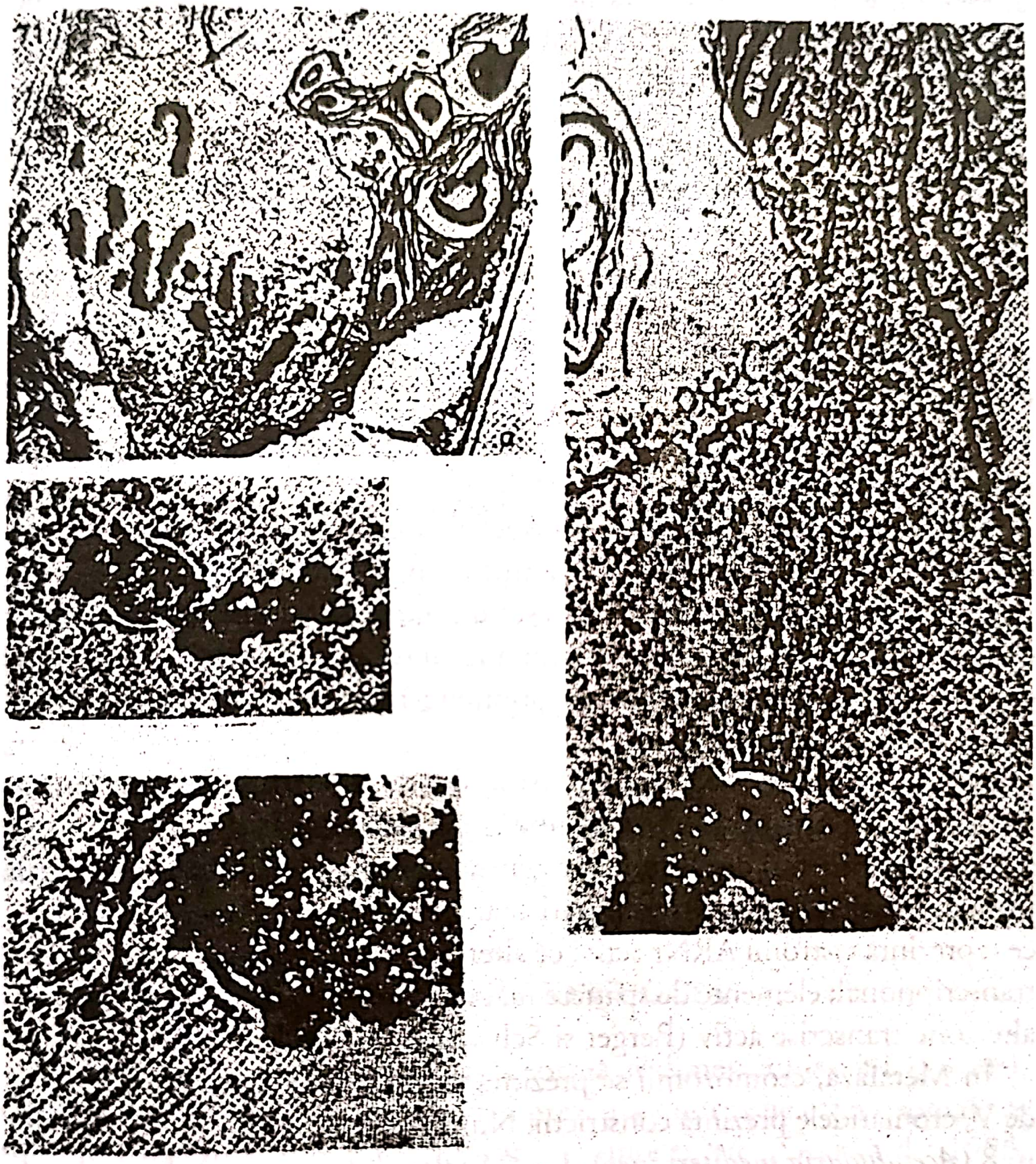


Fig. 5 — Ultrastructura nucleului și a cromozomilor la *Oedogonium cardiacum* (după Picket - Heaps, 1975, preluat din Gavrilă, 1978) a, Anafaza incipientă cu un cromozom precoce migrat ai cărui microtubuli centromerici se extind într-o evaginare a membranei nucleare (săgeata); b, detaliu în care se evidențiază microtubulii (t) de la cinetocor (k) spre evaginarea membranei nucleare; cinetocorii metafizici pereche; d, cinetocor anafazic unic, în care se pot decela 6 sau 7 straturi separate (b, X 23000; c, X 25000; d, X 39000).

evidențiat 22 cromozomi (Gavrila, 1973), constatându-se prezența unui cariotip simetric (Stebbins, 1971). Există și un determinism cromozomal al sexului, generat de prezența heterozomilor și au fost puse în evidență fenomene de partenogeneză. În cazul în care meioza nu are loc la germinarea zigotului, se formează poliploizi.

9. ORDINUL SIPHONALES / SIPHONOCLADALES

Acest ordin are ca reprezentanți alge verzi de tipul *Acetabularia, Valonia, Codium, Boodlea* etc. și prezintă nuclei foarte mici, de 2-6μm, mitoza este normală. Nucleul interfazic are aspect reticulat, prezentând cromocentrii. Cromatina este laxă și formează o rețea de fibre și granule (Burr și colab., 1971). La *Codium fragile* a fost evidențiată și prezența nucleolului. Placa metafazică este obișnuită .

Meioza este tipică, tetradele cu nucleii **n** ce rezultă în urma meiozei, dau nastere prin mitoze haploide la nucleii **n** ai gameților.

În cazul *Dasycladaceelor*, celula este uninucleată cu un nucleu primar, endopoliploid; prin diviziunea acestui nucleu rezultă, în urma unei amitoze complicate și, ulterior, prin diviziuni obișnuite, restabilirea volumului nuclear inițial.

La *Acetabularia mediterranea*, studiile de microscopie electronică, întreprinse de Spring și Trendelenburg (citați de Nagl, 1977) au pus în evidență fenomenul de amplificare genică pentru genele ARNr, în nucleul primar. Nucleii prezintă subunitați mari, nucleolare, acoperite de fibrile ce reprezintă cistronii ARNr activi ce alternează cu zone de spațiere inactive transcripțional; elemente de spațiere mai mari pot fi evidențiate însă pentru alte zone transcrise activ (Berger și Schweiger, 1975).

În Metafază, cromozomii se prezintă sub formă de baghete scurte sau de V, cromatidele prezintă constricții. Numărul de cromozomi variază între n=8 (*Acetabularia mediterranea*) și n=24 (*Boodlea composita*). Fenomenele de endomitoză generează poliploidia nucleilor secundari, la *Cympolia*. Se înregistrează și serii aneuploide (*A. mediterranea* n=8, 10, 20).

10. ORDINUL CLADOPHORALES

Acest ordin are ca reprezentanți alge din genurile: *Cladophora, Chaetomorpha, Rhizoclonium* etc. Celulele acestor alge sunt de obicei polienergide, având între 5-200 nuclei (Wik și colab., 1970). Fusul de diviziune este intranuclear (Mc Donald și colab., 1975) și s-a evidențiat prezența unui nucleol. În timpul Diakinezei apar bivalenți și chiasme. Mitoza la această algă este de tip obișnuit, cu fus de diviziune intranuclear (Gavrila, 1973), cu placă metafazică mai puțin compactă.

Cromozomii sunt submetacentrici, acrocentrici și subtelocentrici. La *Cladophora glomerata,* cariotipul este alcătuit din 24 de cromozomi de tip telocentric, subtelocentric și submedian, grupați în 12 perechi (Fig.6). Dimensiunile cromozomilor au valoare taxonomică, iar haploizii au cromozomi în general mai mari decât diploizii. (ex. La *Cladophora sericea,* forma haploidă (n) aceasta este de 3.1-5.9µm, iar la forma diploidă (2n), aceasta este de 2.9-5.1µm). În urma izolării geografice speciile de *Cladophora* din Islanda au cromozomi mai mari, comparativ cu speciile din Mediterana care au cromozomi mai mici.

Autopoliploidia, alopoliploidia precum și serii poliploide se întâlnesc la *Cladophora glomerata* la care n=x=6 cu 12, 18, 24, 48, 72, 96.

Aneuploidia a fost pusă în evidență la *Rhizoclonium tortuosum* cu 2x-1=11 cromozomi. La *Cladophora glomerata* s-au decelat heterozomi (Jonsson și colab., 1971) care, dacă sunt prezenți în proporție egală, vor genera 50% taluri mascule și 50% taluri femele. Prezența unui singur tip de heterozom generează numai femele 100%.

11. ORDINUL CONJUGATA

Nucleii interfazici sunt variați ca formă și dimensiuni: sferici, ovoizi, elipsoizi etc. și sunt caracterizați prin prezența unor zone cromozomale ce se colorează mai intens, denumite cromocentrii (Godward ,1956, Abhayavardhani și Sharma, 1982), prezentându-se sub formă de mase rotunjite sau sub formă de tetrade alungite. Acești cromocentrii variază nu numai ca formă și dimensiuni, dar și ca număr (Harada ,1981) având importanță citotaxonomică în cadrul conjugatelor (Godward ,1956). S-a constatat că există o corelație între numărul de nucleoli, numărul de cromozomi organizatori nucleolari și nivelul de ploidie atins (Godward, 1950).

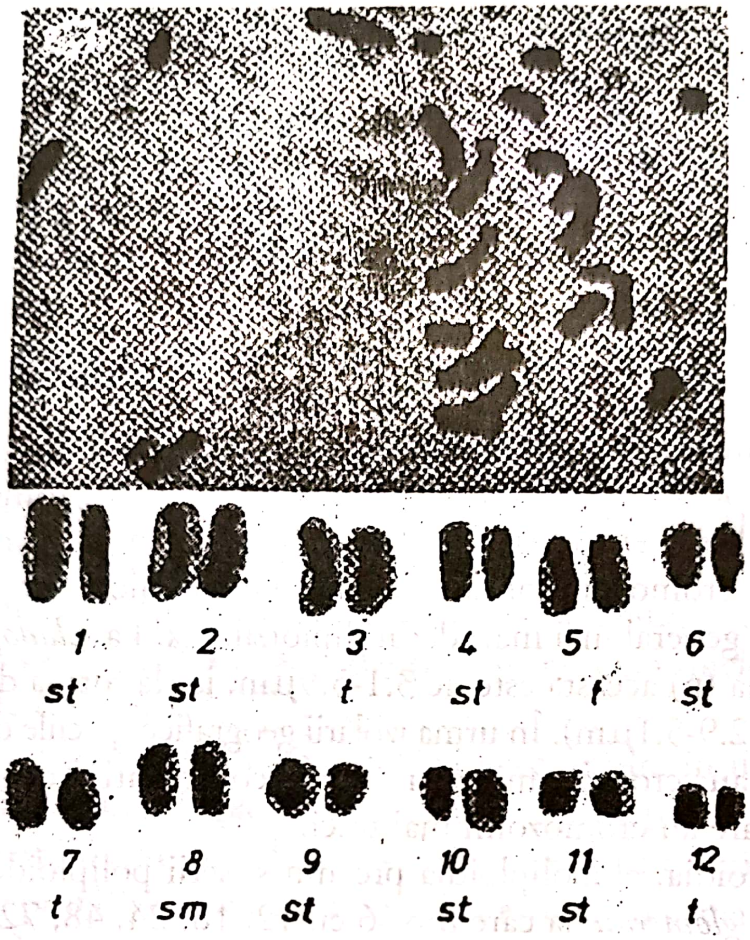


Fig. 6 — Cromozomii metafazici (a) și cariotipul (b) la *Cladophora glomerata* (după Gavrilă, 1978).

Complexitatea organizării interne a nucleolilor este cea mai specifică trasătură la *Conjugate* , incluzând aici și *Desmidiaceele.* Nucleolii sunt caracterizați prin prezența unor tracturi nucleolare ce traversează regiunile organizator nucleolare, aparținând cromozomilor organizator nucleolari (O.N.) (Godward, 1950) .Aceasta este o regiune delimitată precis în care se afla localizate gene structurale responsabile de reconstrucția celor doi nucleoli-fii. Lucrările lui King (1959) asupra desmidiaceelor au demonstrat existența a 4 tipuri de nucleoli:

i) nucleoli solitari și simpli
ii) de mici dimensiuni (majoritatea), dar distincți.
iii)nucleoli compuși prin asocierea mai multor nucleoli
iv) complex organizați , sub forma de șiraguri sau având un aspect sinuos.

CAPITOLUL XXXII

GENOMUL NUCLEAR AL LICHENILOR, MUȘCHILOR ȘI FERIGILOR

1. LICHENII

Lichenii sunt asociații simbiotice între un micobiont (fungi) și un fotobiont (algă verde și/sau cianobacterie). Dintre cele 13.000–17.000 de specii existente de licheni, aproximativ 10% conțin o cianobacterie. Există 3 tipuri de licheni: bipartiți – la care cianobiontul este unicul fotobiont (cianobacteria având rol în fotosinteză și în fixarea azotului), tripartiți (unde și alga verde face parte din simbioză – la care cianobacteria are rol principal de fixare a azotului) și licheni la care cianobacteriile sunt găzduite în structuri morfologice diferite: în cefalodia internă/externă la lichenii tripartiți și în tal la lichenii bipartiți.

La lichenii bipartiți, stratul cianobiont este continuu, din care cauză este relativ ușor pentru cianobacterie să se dividă și să crească impreună, la marginea talului. In asemenea condiții, nu este nevoie de mai mult de o infecție, care să genereze mai multe tulpini de cianobacterie (de exemplu, *Nostoc*), într-un singur tal. La lichenii tripartiți, populația cianobacteriană este restrânsă la o cefalodie mică, separată de zone populate numai de fungi și de alge verzi. Fiecare cefalodie este produsul unei noi infecții. La *P. aphthosa*, care are cefalodia externă situată pe fața superioară a talului, cefalodia veche eliberează hormogonii – filamente mobile de *Nostoc* (Paulsrud și Lindblad, 1998).

Există foarte puține date de Genetică moleculară la licheni, datorită dificultății studiului acestor organisme – paradox al lumii vii. În ultimii ani, au fost totuși abordate unele probleme de biologie moleculară a lichenilor.

Prin utilizarea unui primer specific de la ascomicete, s-a realizat amplificarea regiunii interne (spacer) transcrise a ADN nuclear ribozomal repetitiv, din extractele totale de ADN lichenic, de la *Peltigera malacea, P. aphthosa, P. britannica, P. leucophlebia, Nephroma expallidum* și *N. arcticum*. Compararea secvențelor 5,8 S a indicat că ele aparțin micobiontului și că primerul specific ascomicetelor este adecvat pentru a realiza amplificarea ADN fungal din extractele de ADN lichenic total (Goffinet și Bayer, 1997).

Lichenii au o subunitate ribozomală nucleară mică (ADNr SSU) de peste 1800 nucleotide, mai mare decât aceea de la eucariote (18S). *Lecanora dispersa* conține inserții (introni aparținând grupului I) în 8 poziții distincte ale ADNr SSU, în timp ce *Calicium tricolor* și *Porpidia crustulata* conțin numai câte o singură inserție, iar *Mycocalicium albonigrum* conține două asemenea inserții (Gargas și colaboratorii, 1995). Subunitatea ribozomală mică (ADNr SSU) prezintă regiuni cu grad înalt de conservare, în care au fost decelate inserții sub 100 de nucleotide și care sunt de fapt forme degenerate ale intronilor din grupa I, prezente în aceleași poziții și la alte organisme. In poziția 1512, în ADNr SSU (comparativ cu cel de la *E. coli*) al lichenului *Arthonia lapidicola* s-a identificat o inserție de 63 nucleotide (P10) între regiunile flancatoare (corespondente lui P1 și P2). Aceste mici inserții sunt introni degenerați, care au importanță pentru elucidarea evoluției și a funcției catalitice a intronilor din grupa I (Grube și colaboratorii, 1996).

Intronul ce întrerupe anticodonul AAT/UUA al genei pentru ARNt^{Leu} este conservat de la cianobacterii până la cloroplastele plantelor și a fost studiat, utilizându-se drept probă ADN din talul lichenic proaspăt, prin reacție PCR, prin analiza pattern-ului de polimorfism conformațional monocatenar (SSCP) al produșilor obținuți prin PCR și al fragmentelor clonate și prin secvențierea nucleotidelor din intronii clonați. Lichenii analizați au aparținut la 4 specii diferite: 2 licheni cefalodiați tripartiți *(Nephroma arcticum)*, cu cefalodie internă și *Peltigera aphthosa*, cu cefalodie externă, ceilalți 2 licheni fiind bipartiți: *P. membranacea* și *P. canina*. Intronii UAA ARNt^{Leu}, obtinuți prin reacție PCR, au fost restrictați cu enzimele *SmaI* și *EcoRI*, ligați în vectorul *pBluescript II SK+* și apoi transferați în *E. coli*. Secvențele intronice ale acestor licheni ce prezintă omologii înalte cu tulpinile *PCC7120* de *Anabaena* sp. și de *A. azollae*, precum și cu tulpina *PCC73102* de *Nostoc sp.* și de *N. muscorum* au fost utilizate pentru construirea unui model de structură secundară a intronului transcris.

La toate speciile de licheni, în regiunile variabile, situate între bazele 99–143 și 219–222, inserțiile și delețiile provoacă diferențe structurale mai degrabă decât variații ale numărului de nucleotide. Regiunea cu variabilitate structurală apare ca o buclă, corespunde bazelor 68–73, la tulpina *PCC7120*, de *Anabaena*, și este responsabilă de divizarea intronilor lichenici în 2 clase. Cele 2 clase ale buclei variabile conțin ambele repetiții de secvențe foarte asemănătoare: împerecherea bazelor GAUUU/AAAUC, pentru clasa 1, și GAGU/ACUC, pentru clasa 2, repetate de câteva ori. Numerele diferite ale acestor repetiții duc la diferențele de mărime dintre clase.

Regiunea intronică variabilă, de la *Anabaena PCC7120* , cuprinsă între bazele 99–143, prezintă două pattern-uri de bază, pentru toate secvențele lichenice: un pattern al lichenilor bipartiți *(P. membranacea* și *P. canina*), ale căror cianobacterii sunt atât fotobionți simbiotici cât și bionți fixatori de azot, și al lichenului *N. muscorum* – organism fototrofic liber, iar cel de-al doilea pattern – al celorlalți licheni, precum și al tulpinii *PCC73102* de *Nostoc* (izolat inițial din simbioza cu cicadeea *Macrozamia*), cianobacteriile având drept rol simbiotic principal fixarea azotului.

Variabilitatea secvenței intronului UAA ARNt$^{l.eu}$ este un marker al diversității genetice și al specificității cianobacteriilor simbiotice la unii licheni, fapt demonstrat prin analiza secvenței de nucleotide a intronului transcris. Intronii UAA ARNt$^{l.eu}$ din cianobacterii (simbionți *Nostoc*) au fost amplificați, fără extracția prealabilă a ADN din speciile de licheni: *Nephroma arcticum, Peltigera aphthosa, P. membranacea* și *P. canina*. Fiecare tal lichenic conține un singur tip de intron, ceea ce indică faptul că fiecare tal este colonizat o singură dată sau că există un grad înalt de specificitate (Paulsrud și Lindblad, 1998).

2. FERIGILE

Ferigile sunt reprezentate de 250 de genuri și 10.000 de specii, clasificându-se în două grupe majore: eusporangiate și ferigi leptosporangiate. Condiția eusporangiata este un caracter plesiomorf care se întâlnește și la alte plante vasculare. Condiția leptosporangiată este un caracter apomorf, leptosporangiile fiind prezente numai la ferigile leptosporangiate. Ferigile leptosporangiate sunt un grup monofiletic, de vreme ce în genomul cloroplastic genele sunt aranjate într-un mod particular. După morfologie, ferigile leptosporangiate se clasifică în 3 grupe majore: *Marsileaceae*, *Salviniaceae*, incluzând *Azollaceaeele*, restul aparținând diferitelor alte ordine.

Plantele vasculare primitive sporifere (*Psilotales*, *Lycopodiales* și ferigile Eusporangiate) au număr mare de cromozomi. Cariotipurile pot fi considerate simetrice, majoritatea cromozomilor fiind metacentrici și cu diferențe mici între cromozomii cei mai mari și cei mai mici ai complementului. Majoritatea ferigilor au un număr de cromozomi de câteva ori mai mare decât cel al celorlalte plante diploide. Ferigile heterospore *(Selaginella, Isoetes, Marsilia, Salvinia)* prezintă cromozomi de dimensiuni mai mici comparativ cu cele homospore (Gavrilă și colaboratorii, 1989).

Majoritatea ferigilor homospore au un număr de cromozomi de câteva ori mai mare decât cel al angiospermelor diploide, fiind considerate a avea origine poliploidă. Speciile cu cel mai mic număr de cromozomi (n = 27–52) au un număr de izoenzime specific plantelor diploide. Banca de gene (ADN restrictat cu *Sau3A1*, fragmente de 15–20 kb fiind clonate în vectorul fagic *Charon 35*) a ferigii homospore *Polystichum munitum* (n = 41) a fost secvențiată pentru determinarea gradului de omologie cu genele de legare a clorofilei *a/b (CAB)* din plantele superioare. Fragmentele de ADN fagic recombinant, conținând ADN neamplificat de *P. munitum* (3 x 10^5 fagi), hibridizat cu o probă din regiunea codificatoare *Cab-3C* (din situsul *HindIII*, situat în mijlocul genei și situsul 3” al *XbaI*, până la codonul stop) a genei *CAB* tip *I PSII*, de la tomate, au fost clonate în plasmida *pBluescript*, în scopul determinării secvențelor de nucleotide.

Pe această cale, s-au identificat 50 fagi pozitivi, 6 dintre ei (3 — 8) fiind purificați prin creștere pe plăci. Cele 6 clone conțin segmente diferite din genomul lui *P. munitum*. Gena *CAB* este funcțională și conține un intron cu situsuri consens de splicing (5”-GT … AG-3“) în aceeași poziție ca și genele *CAB*, tip *II PSII*, de la angiosperme și o genă *CAB*, nespecifică, de la un mușchi. Această genă codifică pentru un polipeptid de 265 aminoacizi.

Intronul este flancat de exonii 1 și respectiv 2, ambii având grad ridicat de conservare. Exonul 1 din gena clonei 3 codifică pentru 36 resturi aminoacizi și pentru primii 13 aminoacizi ai proteinei *CAB* mature. Secvența de aminoacizi codificată de exonul 1 (cu excepția primilor câțiva codoni și ai ultimilor 5 codoni) prezintă variabilitate ridicată la angiosperme, secvența exonică a ferigii având divergență înaltă față de celelalte secvențe *CAB* cunoscute. Exonul 2 al genei *CAB* din clona 3 codifică o proteină cu 85% omologie de secvență cu celelalte proteine *CAB* de tip *I* și *II PSII*.

Gena *CAB* din clona 3 are structură tipică genelor funcționale *CAB* de la mușchi și de la angiosperme. Omologia de secvență a segmentului proteinic, codificat de exonul 2 al genelor *CAB* la ferigi, mușchi și tomate este de 84.3%, pentru *MI/II-T5*, de 87%, pentru *F3/MI* și pentru *F3/II-T5*, de 87.5%, pentru *MI/I-T3C*, de 88%, pentru *I-T3C/II-T5* și de 90.3%, pentru *F3/I-T3C* (*F3* = gena *CAB* la clona 3 de la ferigă. *M1* = gena *CAB* a mușchiului; *I-T3C* = gena *CAB Cab-3C* de tip *I PSII*, la tomate; *II-T5* = gena *CAB Cab-5* de tip *II PSII*, la tomate). Cu toate acestea, acest segment nu conține secvența înalt conservată Met-Arg-Arg sau Met-Arg-Lys, la situsul de procesare a peptidului de tranzit, ci prezintă secvența Met-Met-Ala.

Gena *CAB* din clona 7 conține exonii 1 și 2 și intronul în aceleași poziții ca și gena *CAB* din clona 3. Exonul 2 are deletat un nucleotid, iar două substituții nucleotidice generează codoni nonsens (stop). Omologia de secvență dintre regiunea codificatoare a acestei gene cu gena *CAB* din clona 3 și cu genele *CAB PSII* de la angiosperme este mult mai mică, comparativ cu gradul de omologie al genei din clona 3, cu secvențele *CAB* ale angiospermelor. Genele *CAB* din clonele 6 și 8 conțin numai regiunea centrală a exonului 2, exonul 1 lipsind complet. Secvențele din clonele 6 și 8 ce prezintă deleții și inserții, precum și mutații nonsens, fac ca genele *CAB* din aceste clone să fie nefuncționale. Ambele conțin o deleție de 8 nucleotide, exact în aceeași poziție, iar secvențele codificate de proteine sunt foarte similare, dar diferite de celelalte secvențe *CAB* cunoscute.

La angiosperme, genele de tip *I PSII* nu conțin introni, iar genele de tip *II* conțin un singur intron. Acest intron este prezent și în gena *CAB*, de la mușchi, și de la două specii de ferigi ce prezintă omologie de secvență cu regiunile codificatoare 5' și 3' ale genelor *CAB* (genele *CAB*, din clonele 3 și 7). Secvențele nucleotidice ale exonului 2 diferă în proporție de 12%, în cazul genelor *CAB*, de tip *I* și *II*, de la tomate. Proteina codificată de gena *CAB*, din clona 3 de la ferigă, are diferență de omologie de 9,7%, comparativ cu proteina de tip *I PSII*, de la tomate și de 13%, comparativ cu proteina de tip *II PSII*, de la tomate. Acest fapt sugerează divergența liniilor genelor *CAB* de tip *I* și *II PSII*, puțin înainte sau imediat după separarea ferigilor de angiosperme. Alte tipuri de gene *CAB* de la angiosperme codifică proteine cu grad mult mai ridicat de divergență (60–70%), sugerând separarea acestor linii înainte de separarea ferigilor de angiosperme.

P. munitum conține un număr mare de gene *CAB PSII* nefuncționale, spre deosebire de genomul tomatelor care conține opt gene *CAB* funcționale, de tip *I* și două gene *CAB* funcționale de tip *II* și numai o singură genă truncată de tip *I*.

La genomurile mamiferelor, pseudogene nefuncționale multiple apar prin reverstranscrierea ARNm și prin integrarea copiei de ADN în cromozom. Majoritatea secvențelor izolate și caracterizate prin secvențierea nucleotidelor reprezintă gene *CAB* defective (nefuncționale), în timp ce la majoritatea angiospermelor diploide, copiile familiei de gene *CAB* sunt funcționale. S-au emis 3 ipoteze referitoare la existența genelor *CAB* în genomul lui *P. munitum*. Prima ipoteză susține că genele *CAB* defective nu au fost amplificate de către un intermediar ARN, deoarece numai una dintre ele (din clona 7) conține un intron, iar celorlalte două (din clonele 6 și 8) le lipsesc capetele 5' și 3' ale regiunii codificatoare și nu prezintă nici o coadă poli-A. Clonele 6 și 8 pot reprezenta o secvență genomică amplificată sau pot fi alele (cu deleții mari, pe ambii cromozomi omologi, la acest locus). O a doua ipoteză presupune că *P. munitum* n-a suferit niciodată fenomenul de poliploidizare, ci s-a pornit de la un complement normal de gene *CAB PSII* care, ulterior, au suferit mutații și au devenit nefuncționale. Cea de a treia ipoteză consideră că genomul lui *P. munitum* a fost inițial de tip poliploid, ulterior suferind procesul de diploidizare ce a implicat și apariția de mutații la nivelul multiplelor copii genice care au devenit astfel nefuncționale.

Chiar dacă numărul genelor *CAB* de la *P. munitum* este mult mai mare decât cel de la angiospermele diploide (3–17), totuși nu se poate face distincția dintre amplificarea genică specifică și poliploidia primitivă. Prin urmare, în practică, silențierea genelor și originea poliploidă a speciilor de ferigi cu n = 27–52 poate fi demonstrată numai dacă genele defective multiple sunt gene nucleare ce includ familiile genice și genele existente într-o singură copie la angiosperme (Pichersky și colaboratorii, 1990).

Genele *MADS* sunt gene homeotice ce codifică o clasă de factori de transcriere cu rol în controlul dezvoltării organelor florale. Cutia *MADS* conține 60 de aminoacizi cu rol în legarea și dimerizarea ADN. La plante, genele *MADS* au o cutie K suplimentară, ce conține 70 de aminoacizi și care formează elice amfipatice, implicate în interacțiunile proteină-proteină. Genele *MADS* formează la ferigi 3 grupe divergente, mai puține decât la spermatofite. Clonarea a 5 gene *MADS (CMADS 1, 2, 3, 4* și *6)* din feriga *Ceratopteris richardii* a permis alcătuirea unui arbore filogenetic a secvențelor parțiale de aminoacizi ale plantelor spermatofite și ale genelor *MADS* de la ferigă, confirmând că genele formează la ferigă 3 subfamilii. Faptul că patru din cele cinci gene analizate s-au exprimat similar în organele reproducătoare și în cele vegetative a dus la ipoteza că genele *MADS* s-au exprimat global în organele plantei și, pe măsura specializării organelor florale, numărul genelor *MADS* a crescut pe când pattern-ul exprimării anumitor gene a devenit mai restrâns.

Restricția cu *Sau3AI* a clonelor de ADN obținute prin reacția PCR, folosind un primer degenerat, specific cutiei *MADS: 5'-CAUCAUCAUCAUAARAARGCITAYGARCTI-TCNTCNGT-3'* (*R* = *A* sau *G, I* = inozina *Y* = *C* sau *T, N* = *A,C, G* sau *T)* și un primer adaptor: *[5'-CUACUACUACUAGGCCACGCGTCGACTAGTACT*$_{16}$*-3']* a permis identificarea a 5 grupe distincte. Fiecare grupă a fost reprezentată de 104, 1, 7, 39 și 7 clone, iar 17, 1, 5, 7 și 4 clone din fiecare grupă au fost secvențiate. Secvențierea a confirmat faptul că fiecare grupă reprezintă o genă distinctă. Genele au fost denumite *CMADS 1, 2, 3, 4* și *6.*

CMADS 1,2,3,4 și *6* codifică proteine ce conțin regiunea *MADS*, precum și regiunea *K* – un domeniu conservat la toate genele *MADS* ale plantelor *(6, 8–10).* Codonii de inițiere ai genelor *MADS* de la angiosperme sunt localizați lângă capătul 5' al secvenței ce codifică domeniul *MADS*, cu excepția majorității membrilor din subfamilia *AGAMOUS (AG)* a genelor *MADS* de la spermatofite. *CMADS 1* conține secvența 5' întâlnită la membrii subfamiliei *AG*, în timp ce *CMADS 2, 3, 4* și *6* sunt lipsite de această secvență. *CMADS 1* și grupul *AG* codifică proteine cu aminoacizi suplimentari amino– terminali. *CMADS 1, CMADS 2/3/4* și *CMADS 6* sunt incluse în *CRM6, CRM1* și *CRM3* la *Ceratopteris.*

Genele *CMADS 1, 2* și *3* au pattern-uri similare de exprimare în aproape toate țesuturile sporofitice, însă rata de exprimare în fiecare țesut este diferită, pentru fiecare genă în parte. *CMADS 2* și *3* sunt exprimate predominant în gametofiți, iar exprimarea genei *CMAD 6* predomină în ganetofiții hermafrodiți. Pattern-urile de exprimare ale celor 4 gene *CMADS 1, 2, 3* și *4* sunt foarte similare în țesuturile sporofitice vegetative și reproducătoare, deși exprimarea genei *CMADS 4* predomină la nivelul rădăcinilor. Această suprapunere a patern-urilor de exprimare, în special la nivelul genelor *CMADS1, 2* și *3* indică faptul că aceste gene pot avea funcții redundante, chiar dacă aparțin la clase diferite. Deși nu se cunosc funcțiile genelor *CMADS*, pattern-urile lor de exprimare în regiunile sporofitice meristematice sau primordiale indică faptul că acești potențiali factori de transcriere pot fi implicați în reglarea diviziunilor celulare, în inițierea și dezvoltarea timpurie a tuturor organelor.

Numărul subfamiliilor genice *MADS* este mai mare la angiosperme (peste 10) decât la cele 3 grupe de la ferigi (8–10). La spermatofite, unele gene *MADS* sunt exprimate în primordiile specifice ale florii ca gene homeotice selectoare, în timp ce alte gene *MADS* sunt exprimate, ca și la ferigi, atât în organele vegetative, cât și în cele reproducătoare (8–10).

Patternul spațial și temporal al exprimării celor cinci gene *MADS* de la ferigă a fost stabilit prin analize Northern blot și prin hibridizări *in situ*. *CMADS 1, 2, 3* și *4* sunt exprimate similar în regiunile meristematice și în primordiile sporofitelor lăstarilor și rădăcinilor, ca și în organele lor reproducătoare, deși gradul de exprimare în fiecare țesut este diferit pentru fiecare genă în parte. *CMADS6* este exprimată în țesuturile gametofitice, dar nu și în cele sporofitice. Lipsa exprimării specifice a genelor *MADS* în părțile reproductive ale sporofitului ferigii *Ceratopteris richardii* indică restricția exprimării genelor *MADS* strict în organele reproductive specifice, ca și funcționarea lor specializată ca gene homeotice selectoare în plantele spermatofite, având importanță în evoluția organelor florale (Hasebe și colaboratorii, 1998).

Cutia genică *MADS* cuprinde o familie de factori de inițiere a transcrierii, cu grad înalt de conservare, cu rol în traducerea semnalelor și în controlul dezvoltării plantelor, animalelor și fungilor. Domeniile proteinice *MADS*, ca și alți numeroși factori de transcriere de la eucariote, au o organizare structurală modulară, conținând domeniile: *MADS (M-)*, de intervenție *(I-)*, de tip keratinic *(K-)* și C- terminal *(C-)*. Domeniul *M-* este N- terminal, fiind regiunea proteinică cu gradul cel mai înalt de conservare. Acest domeniu este factorul determinant de legare la ADN, favorizând dimerizarea și funcționarea factorului suplimentar accesoriu de legare.

Domeniul *I-* conține aproximativ 30 aminoacizi și este situat în aval față de domeniul *M-*. Domeniul conservat *K-* nu se găsește la animale sau la fungi și conține aminoacizi hidrofobi situați la distanțe regulate, formând un helix amfipatic. Acest helix amfipatic interacționează cu o altă regiune proteinică a domeniului *K-*, favorizând dimerizarea. Domeniul *C-* este regiunea cea mai variabilă, atât ca secvență de aminoacizi cât și ca lungime și este localizat la capătul C- terminal al proteinelor. Funcția acestui domeniu este necunoscută, deși intervine în legarea la ADN și în dimerizarea proteinelor în anumite domenii *M-* proteinice, homeotice, de la plantele cu flori.

La ferigi, genele *MADS* se exprimă atât în faza haploidă (gametofitică) cât și în faza diploidă (sporofitică), fapt care sugerează implicarea genelor de la ferigi în controlul dezvoltării sau al diferențierii celulare, pe lângă funcțiile restrânse ale genelor homeotice – de determinare spțială și temporală a identității organelor florale la angiosperme.

La *Ceratopteris* au fost izolate 7 gene *MADS: CRM1–CRM7*, de tip *MIKC*, cu aceleași domenii proteinice *MADS. CRM1, CRM2, CRM4* și *CRM5* au omologie ridicată de secvență în domeniile *I-* și *C-*. Omologia de secvență dintre genele *CRM* și genele *MADS* de la spermatofite indică faptul că ele au un ancestor comun, din care au derivat prin duplicații multiple, diversificare de secvență și fixare.

La gimnosperme și la angiosperme există 4 tipuri de gene *MADS* (gene de tip *AG-, AGL2–, AGL6–* și *TM3–*), indicând faptul că cel puțin 4 tipuri diferite de gene *MIKC* au existat la strămoșul comun al spermatofitelor, acum 285–350 milioane de ani. Pe baza analizei secvențelor genice *MADS* de la spermatofite s-a putut trage concluzia că genele florale homeotice au apărut acum 340 milioane de ani (Munster și colaboratorii, 1997).

3. BRIOFITELE

Briofitele au în cea mai mare parte o destul de mare asimetrie cariotipică, dar la cele mai multe, majoritatea cromozomilor sunt metacentrici sau subtelocentrici La briofite, și în particular la *Hepaticae*, heterocromatinizarea este bine exprimată. Talul haploid al acestor plante este la unele specii monoic, cu anteridii și arhegoane pe același tal (plantă), iar la alte plante este dioic, cu tal femel ce poartă arhegoane și tal mascul care produce anteridii. Speciile monoice (genurile *Calypogeia, Diplophyllum, Fossombronia* și *Lejeunea* dintre *Jungermanniales*, precum și toate genurile familiilor *Ricciaceae, Targioniaceae* și *Reboulíaceae*, precum și patru genuri din *Marchantiaceae*, dintre *Marchantiales*) prezintă cariotipuri caracterizate printr-o cantitate minimă de heterocromatină. Cel mai mic cromozom al complementului este parțial sau total heterocromatic, unul sau mai mulți cromozomi mai mari posedând regiuni heterocromatice lângă centromer sau pe brațul scurt. Speciile dioice conțin mai multă heterocromatină, la *Conocephalum* și la *Marchantia*, în cel mai mic cromozom, iar la *Jungermanniales* – în cromozomul cel mai mare, și mai mult plantele mascule, decât cele femele. Genurile *Pellia* și *Sphaerocarpos* au câte o pereche dimorfă X – Y de cromozomi, derivată prin diferențierea din cel mai mare cromozom. Speciile dioice de *Jungermanniales* conțin mai multe regiuni heterocromatice decât speciile monoice, la nivelul a doi sau al mai multor cromozomi mai mari.

Cromozomii de *Hepaticae* sunt importanți pentru studii citologice și genetice, putând fi ușor identificați, între specii existând relații strânse. Cariotipul speciei monoice *Metzgeria conjugata* este aproape exact același, ca număr de cromozomi, morfologie și grad de heterocromatinizare, cu cel al gametofitului femel de la specia dioică *Metzgeria hamata*. Specia *M. hamata* are strămoș comun cu *M. conjugata*, evoluția constând în creșterea heterocromatinizării celui mai mare cromozom al complementului (Gavrilă și colaboratorii, 1989).

Predecesori ai plantelor superioare, mușchii reprezintă modele experimentale de studiu al dezvoltării și al transmiterii semnalelor, prin superexprimarea transgenelor, după transformarea genetică.

Mușchiul *Physcomitrella patents* este folosit drept model genetic pentru studiul dezvoltării plantelor, datorită faptului că gametofitul haploid predomină în ciclul său de viață. Pentru determinarea eficienței genelor țintă, la acest mușchi, s-au efectuat experimente de transformare (Schaefer și Zryd, 1997).

La mușchiul *Physcomitrella patents (Hedw.) B. S. G.* și anume, la tipul sălbatic (WT), la doi mutanți (PC22 și P24) și la un hibrid somatic PC22 (+) P24, s-au efectuat analize genomice, prin tehnici citologice și moleculare. Metoda citologică (colorarea cromozomilor metafazici) a permis evidențierea a 54 ± 2 de cromozomi, la hibridul somatic, și a 27 de cromozomi, la tipul sălbatic și respectiv la mutanți. Cei 27 bivalenți meiotici ai tipului sălbatic au dimensiuni cuprinse între 1–2 μm. Cromozomii metafazici au lungimea de 0,5–1 μm, fiind prea mici pentru a putea fi bandați. Conținutul în ADN/nucleu, determinat prin tehnica flowcitometrică (FCM), a fost de 0.6 pg (WT, PC22), 1.2 pg (P24) și 1.6 pg (PC22 (+) P24); fiecare genotip a avut câte un singur peak în fluorescență, indicând blocarea ciclului celular pe perioada de lumină a zilei. Hibridizarea Southern a evidențiat prezența de ADN repetitiv în cantități diferite pentru cele 4 genotipuri, însă n-au fost detectate RFLP-uri la cele 4 genotipuri de mușchi. Mutanta P24 are un conținut în ADN nuclear de 100 ori mai mare, comparativ cu tipul sălbatic. Denaturarea termică a ADN din tipul sălbatic a relevat un continut în G + C de 34.6 %, pentru ADN plastidial. Din banca de ADNc, cuprinzând 1.2 x 10^6 clone independente, s-au izolat secvențe omoloage celor de la plantele superioare, reprezentând de fapt familii multigenice (Reski și colaboratorii, 1994).

La *Physcomitrella patents* s-a realizat transformarea stabilă, în urma selectării plantelor rezistente la G418 sau la higromicină B, a fenotipurilor stabile mitotic și meiotic, după îndepărtarea presiunii selective. Genomul mușchiului *Physcomitrella patents* are 7 x 10^8 pb. S-au realizat încrucișări între transformantul *pabA3*, rezistent la antibiotice și transformantul complementar *nicA4*, auxotrof și sensibil la antibiotice. Protoplaști ai tipului sălbatic și ai tipului mutant *pabA3* au fost testați pentru capacitatea lor de a crește în medii cu concentrații crescânde de sulfat de kanamicină, G418 și hidromicină B. Tratamentul de transformare a protoplaștilor de *Physcomitrella patents* a redus viabilitatea cu 10%. Frecvențele inițiale de transformare au fost de 1 – 84 regeneranți/10^4 protoplaști viabili sau 1 – 118 regeneranți/μg ADN. Protoplaștii mușchiului *Physcomitrella patents* au fost transformați și prin introducerea în genomul lor de promotori proveniți de la diferite plasmide: *pLGVneo1103*, *pABD1*, *pHP23*, *pGL2* și *pBR322*. Structura plasmidei a influențat frecvența de transformare, ADN circular plasmidial inducând o frecvență mai mare a regeneranților rezistenți la antibiotice, comparativ cu ADN liniar plasmidial.

Numărul transformanților stabili obtinuți a fost de 3 pe mediu *hyg*, în prezența plasmidei liniare *pGL2*, pe mediu cu higromicină, de 2 pe mediu G418, în prezența plasmidei *pHP23b*, și de 1, pe mediu G418, în prezența plasmidei circulare *pLGVneo1103*. Frecvența plantelor transformate, după 10, 27 și 50 de zile de la tratament, a fost cea mai ridicată pentru plasmida circulară *pHP23b*, pe mediu G418 ($84/10^4$ protoplaști viabili, respectiv 118 regeneranți/μg ADN, după 10 zile, $80/10^4$ protoplaști viabili, respectiv 112 regeneranți/μg ADN, după 27 zile și de $16/10^4$ protoplaști viabili, respectiv 23 regeneranți/μg ADN, după 50 zile). Pe mediu *hyg* cu plasmida circulară *pGL2*, frecvența plantelor transformate a fost de $35/10^4$ protoplaști viabili, respectiv 49 regeneranți/μg ADN, după 10 zile, $13/10^4$ protoplaști viabili, respectiv 18 regeneranți/μg ADN, după 27 zile și, respectiv, după 50 zile.

Genele marker de rezistență la G418 și la higromicină funcționează la *Physcomitrella patents* precum promotorii 19 S și 35 S ai genei *nos* și ai virusului mozaicului conopidei. La transformanții stabili, ADN plasmidial s-a integrat în genomul mușchiului, acești transformanți prezentând ereditate mendeliană a funcționării genelor codificate de plasmidă (Schaefer și colaboratorii, 1991).

Din biblioteca genomică a mușchiului *Physcomitrella patents* s-au izolat 3 clone de ADNc ce conțin o regiune de legare la ADN *myb* și care codifică două clase diferite de proteine de tip *myb: Pp1* și *Pp2,* ce prezintă omologie de secvență numai în regiunea *myb.* Capetele carboxi-terminale ale aminoacizilor *Pp1* și *Pp2* formează structuri alfa-helicale, funcționând ca activatori ai transcrierii. Spre deosebire de genomul celorlalte plante, care conțin numeroase familii genice de tip *myb*, *Physcomitrella patents* conține doar o mică familie genică. Analiza ratelor de transcriere, în timpul dezvoltării mușchiului, a arătat faptul că cele 2 gene sunt transcrise cu intensitate maximă în mușchiul sălbatic, aflat la început de dezvoltare, indicele mitotic având valoare maximă. Mutantele de *Physcomitrella patents* prezintă nivele anormale de exprimare ale celor 2 gene, cu întârzierea creșterii muschiului și cu modificări morfologice. Transformarea tipului sălbatic de *Physcomitrella patents* cu gene antisens ADNc din clonele genice *Pp1* și *Pp2* a redus semnificativ rata transformanților, atunci când s-a exprimat gena reporter. Exprimarea genelor *Pp1* și *Pp2* este esențială pentru creșterea celulară, în timpul dezvoltării gametofitice normale la *Physcomitrella patents* (Leech și colaboratorii, 1993).

Gena adenozinkinazei (*adk*) din mușchiul *Physcomitrella patents (Hedw.) B. S. G.* a fost clonată dintr-o bancă de ADNc, prin complementația funcțională a unei tulpini auxotrofe de *E. coli*. Lungimea întregii bănci de ADNc este de 1175 pb, cu un cadru deschis citirii pentru o proteină de 37.3 kDa. Analiza Southern blotting a relevat prezența unei singure gene pentru adenozinkinază în genomul *Physcomitrella*. Secvența de aminoacizi a avut omologie de 52% cu cea a adenozinkinazei umane (von Schwartzenberg și colaboratorii, 1998).

Stadiul de dezvoltare gametofitică haploidă a mușchiului *Physcomitrella patents* permite analiza detaliată a morfogenezei plantelor la nivel celular. La acest mușchi, s-a realizat transformarea genetică a genelor *tag*, folosind transpozonii de la porumb. Cu ajutorul băncilor de gene s-a realizat studierea activității genelor corelată cu diferitele stadii de dezvoltare, precum și răspunsul la tratamentul cu fitohormoni și la stimuli din mediu. Genele heteroloage implicate în controlul transcrierii și al ciclului celular, ce intervin în reglarea controlului dezvoltării, au fost utilizate pentru identificarea eventualelor omologii la nivelul genomului de *Physcomitrella patents* (Cove și colaboratorii, 1991).

Proteina chimerică, alcatuită din represorul *Tet* codificat și din domeniul de activare al proteinei 16, de la virionul *Herpes simplex Tn10*, inserată în mușchiul *Physcomitrella patents*, activează transcrierea, începând de la un promotor țintă *(Top 10)*, conținând șapte operatori situați în fața cutiei *TATA* (Zeidler și colaboratorii, 1996).

Citokininele majore de la *P. patents* sunt 6 izopentenil aminopurina și zeatina. La mușchiul *Physcomitrella patents* au fost izolate diferite mutante: biochimice (insensibile la hormoni) și morfologice. Mutantele *OVE 9*, ce determină supraproducția de gametofori, și împiedică hibridizarea parasexuată, seamănă cu tipul sălbatic, crescut pe mediu cu concentrații exogene mărite (5–50 μM) de citokinine: 6–furfurilaminopurina (kinetina). Aceste mutante recesive produc de 100 ori mai multă citokinină decât tipul salbatic, în urma pierderii funcționării unora dintre gene. Fenotipul *9 OVE* este rezultatul modificării independente de ARNt, a reglării căii biosintetice a citokininei. Mutantele *OVE 10* seamănă cu tipul sălbatic, crescut pe mediu cu concentrații exogene scăzute (50– 500 nM) de citokinine.

Analiza genetică prin hibridizare somatică a mutantelor producătoare de citokinine (reglatori ai creșterii și dezvoltării plantelor), de la mușchiul *Physcomitrella patents*, respectiv fuziunea de protoplaști, a demonstrat faptul că din 15 mutante gametofitice, producătoare de citokinină *(OVE)*, 14 reprezintă mutații recesive, responsabile pentru acest fenotip anormal. Dintre aceste tulpini, 7 aparțin la 3 grupe de complementație: *OVEA, OVEB* și *OVEC.* Raporturile de segregare fenotipică ale descendenților obtinuți prin autofertilizarea unor hibrizi somatici diferiți indică faptul că mutațiile *OVE* se comportă drept alele recesive ale unei singure gene, cu transmitere mendeliană. Analiza de complementație a tulpinilor mutante furnizează informații despre numărul minim de gene care, prin producerea de mutații, conduc la un fenotip modificat (Featherstone și colaboratorii, 1990).

Centrifugarea în gradient de clorură de cesiu a ADN genomic al mușchiului *Funaria hygrometrica* a dus la obținerea a 3 benzi de ADN satelit (GC2), una reprezentând ADN r. Prin restricția cu *EcoRI*, s-au obținut 3 fragmente mari, care au hibridizat cu subunitățile ribozomale mare și mică de la *Sinapsis alba.* ADN ribozomal a avut 11.132 pb. Analiza ADNr de 18 S, 5.8 S și de 25 S a relevat omologia înaltă de secvență și lungimea identică cu lungimea speciilor corespondente de ARNr, de la plante. La distanța de 10 pb de capătul 5' al ADNr 25 S, se află un intron de 169 pb. Spacer-ul intergenic (IGS) de 5150 pb conține 13 secvențe repetitive, înalt conservate (38 pb, exceptând 2 de 56 pb), urmate de alte 6 secvențe repetitive de 42 – 43 pb. Au fost identificate 2 situsuri de inițiere a transcrierii (TIS), cu unele deosebiri față de cele ale angiospermelor (Capesius, 1997).

Prin metoda PCR, au fost decelați introni la mușchiul *Polytrichum* și la feriga *Rumohra*, cu secvențe variabile și lungimi cuprinse între 11 – 21 pb, și conținând gene nucleare ARNt (Tyr). Intronii pre-ARNt (Tyr) au 2 caracteristici conservate în tot regnul vegetal, și anume: ei au la capătul 5' uridina sau uneori adenozina și au structuri secundare la care un helix anticodon de 4–5 pb este format prin împerecherea bazelor complementare ale nucleotidelor intronului cu cele ale buclei anticodonului (Akama, 1997).

CAPITOLUL XXXIII

GENOMUL NUCLEAR AL PLANTELOR SUPERIOARE

1. INTRODUCERE

Plantele aparținând unor grupe taxonomice variate prezintă o așezare similară a genelor în cromozomi, adică o sintenie conservată. ADN repetitiv variază de la specie la specie, în ceea ce privește concentrația, secvența și pattern-ul de dispersie. De aceea, el este important pentru studii genetice, taxonomice și evolutive. Înțelegerea organizării genelor și a secvențelor repetitive este un element cheie pentru studiul organizării genomului și al evoluției plantelor.

Genomurile nucleare ale plantelor conțin diferite secvențe de ADN (fig. 1). Secvențele telomerice permit menținerea replicării, protejarea capetelor cromozomilor și depășirea problemei produse de terminalizarea replicării. Locii genici ai ARNr 18S, 5.8S și 25S, prezenți laolaltă, într-un număr mic de situsuri, codifică pentru componentele structurale ale ribozomilor. O mare parte din genomul plantelor este reprezentată de secvențe de ADN mobil, adică de transpozoni și de retrotranspozoni. Aproximativ 50% din genomul plantelor este format din retroelemente, care codifică proteinele necesare propriei lor reverstranscrieri și integrări. Drept rezultat al transcrierii lor în ARN, reverstranscrierii în ADN și integrării în genom, retroelementele prezintă o distribuție dispersă în cromozomi.

Telomerele, ADNr și secvențele retroelementelor sunt prezente în genomurile tuturor plantelor și animalelor și pot fi considerate ca provenind din „lumea ARN“, din care a rezultat ADN al tuturor organismelor. Secvențele repetate în tandem au localizare subtelomerică, intercalară sau centromerică. Secvențele repetitive centromerice sunt alcătuite din monomeri de 140–360 pb, care se întind pe mai mult de 1 Mpb. Au fost identificate nucleotide omoloage cutiilor centromerice *CDEIII* și *CENP-B*, de la drojdii, și respectiv, de la om (Kipling și Warburton, 1997) în anumite secvențe genice de la plante, cu localizare centromerică (Nagaki și colab., 1998). Numeroase secvențe repetitive în tandem au o structură complexă, uneori incluzând repetiții simple (Schmidt și colab., 1991) rezultate din rearanjamente și amplificări produse în cursul evoluției.

Hibridizarea *in situ* a permis izolarea și localizarea secvențelor repetitive multiple, fiecare reprezentând o fracție genomică substanțială, precum și elucidarea aspectelor legate de organizarea genomică, structura și orientarea cromozomilor și a markerilor genici.

Sfecla de zahăr *(Beta vulgaris)* este o specie-model pentru analiza organizării cromozomale și moleculare a genomului nuclear: este diploidă (2n=18) și are un genom relativ mic (750 Mpb), care este reprezentativ pentru majoritatea speciilor.

ADN-ul satelit (Hemleben și colab., 1992) prezintă lungimi variate ale monomerilor, fiind frecvent întâlnite cele de 140–180 sau 300–360 pb, corespunzătoare mono- sau dinucleosomilor (Vershinin și Heslop-Harrison, 1998). Microsateliții sunt secvențe repetitive simple (cu pattern-uri de 1–5 pb), iar minisateliții prezintă unități repetitive mai complexe (până la 40 pb) (Weising, 1995). ADN-ul telomeric alcătuit din secvențe repetitive

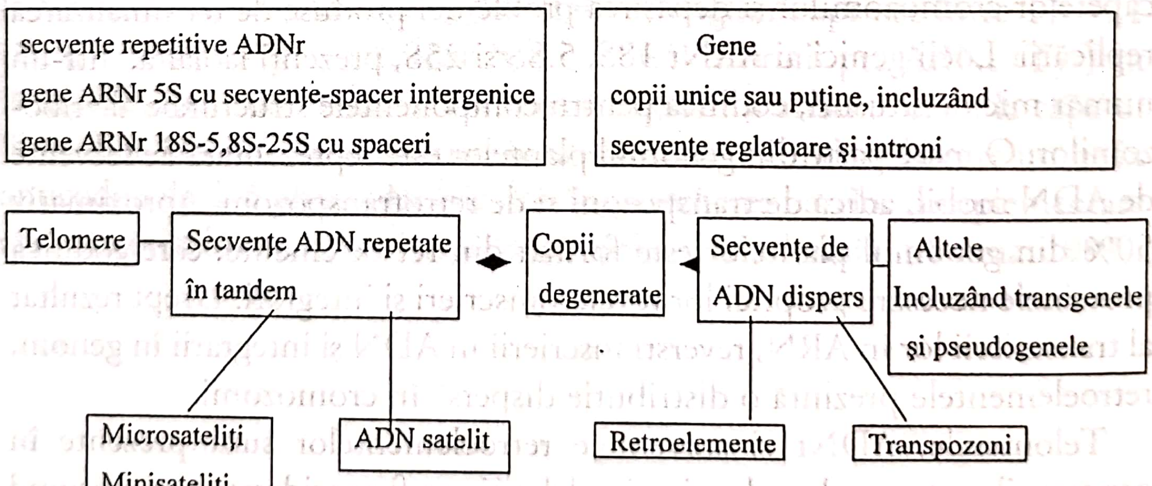

secvențe repetitive ADNr
gene ARNr 5S cu secvențe-spacer intergenice
gene ARNr 18S-5,8S-25S cu spaceri
Gene
copii unice sau puține, incluzând
secvențe reglatoare și introni
Telomere
Secvențe ADN repetate
în tandem
Copii
degenerate
Secvențe de
ADN dispers
Altele
Incluzând transgenele
și pseudogenele
Microsateliți
Minisateliți
ADN satelit
Retroelemente
Transpozoni

Fig. 1 — Secvențele ADN din genomurile nucleare ale plantelor (după Schmidt și Heslop-Harrison, 1998).

conservate de 7 pb *(CCCTAAA)*, este adăugat la capetele cromozomilor, prin activitatea telomerazei (Richards, 1993). Retroelementele amplifică și transpozează prin intermediul ARN și se împart în: secvențe mobile cu repetiții terminale lungi *(LTR)* și retroposoni non-*LTR*, elemente lungi nucleare intersperse *(LINE)* și elementele nucleare intersperse scurte înrudite *(SINE)* (Kunze și colab., 1997) .

Genomurile plantelor conțin și *LTR* unice, elemente transpozabile miniaturale, invers repetate *(MITE)* și secvențe virus-like. Transpozonii sunt elemente ADN, copiile non-autonome putând fi trans-activate de către elementele autonome active (Kunze și colab., 1997). Conexiunile dintre dreptunghiuri indică similitudinile în organizarea genomică; de exemplu, repetițiile ADNr sunt o clasă specială de secvențe în tandem de ADN repetitiv. Săgețile indică schimbările radicale dintre clasele de secvență – divergența și dispersia repetițiilor în tandem, precum și aglomerarea și omogenizarea secvențelor dispersate (după Schmidt și Heslop-Harrison, 1998).

Cele 20 de specii diferite ale genului alcătuiesc un grup important pentru studiile de evoluție a secvențelor genice. Genomul *Beta* conține aproximativ 10 familii de secvențe neomoloage de ADN repetitiv, care au fost intensiv caracterizate la nivel molecular, prin combinarea secvențierii, electroforezei și hibridizării Southern și *in situ*.

Marea majoritate a ADN cromozomal este ADN repetitvi. La sfecla de zahăr, microscopia în fluorescență cu două lungimi de undă diferite a permis hibridizarea *in situ* (semnale roșii, galbene sau verzi), în vederea localizării secvențelor de ADN repetitiv de-a lungul a 18 cromozomi, după colorarea în albastru a întregului ADN cu *DAPI*. Un număr mic de secvențe repetitive reprezintă majoritatea celor 750 Mpb de ADN din genom. Secvența satelitică pBV_1 de 327 pb hibridizează (galben-verde) aproape toți cei 18 centromeri în blocuri megabazice (Schmidt și Metzlaff, 1991), ceea ce indică numerele diferite de copii ale secvenței repetitive. Secvențele centromerice includ un microsatelit, iar oligonucleotidele prezintă grad înalt de hibridizare la aceeași regiune centromerică (Schmidt și Heslop-Harrison, 1996). O altă repetiție în tandem, de 160 pb, pEV_1, hibridizează la situri intercalare pe fiecare braț cromozomal, iar secvențele repetitive în tandem ARNr 5S hibridizează numai cu o pereche de cromozomi. Elementele de ADN mobil – retroelementele — colonizează majoritatea genomurilor de la plante și se amplifică prin intermediul ARN. Familia *Tbv* de retrotranspozoni (Schmidt și colab., 1995) este dispersată de-a lungul cromozomilor, dar lipsește la sateliții centromerici. Hibridizarea *in situ* a permis, de asemenea, evidențierea ADNc în special în regiunile subterminale, dar fără să se suprapună cu secvențele repetitive.

Datele obținute în urma hibridizărilor *in situ* și analizele moleculare sunt în concordanță cu modelul integrativ al organizării cromozomale la plante. Acest model presupune că, la plante, un cromozom conține repetiții în tandem: intercalare, dispersate, asociate cu centromerul, retroelemente dispersate *Ty1* de tip copia-like și microsateliți, repetiții telomerice și subtelomerice, elemente nucleare intersperse lungi (*LINE*, adică retroelemente non-*LTR*), precum și secvențe unice sau în număr mic, inclusiv genele.

Diferite clase de ADN repetitiv prezintă distribuții genomice caracteristice. Genele sunt aglomerate în blocuri discrete între modele variate de ADN repetitiv, fiecare având localizare și organizare genomică caracteristică. *Ty1*–copia și alte familii de retroelemente (repetiții terminale lungi – *LTR*) alcătuiesc 50% din genom (SanMiguel și colab., 1996; Heslop-Harrison și colab., 1997). Retroelementele *LTR* sunt localizate în genom în aglomerări sau în regiuni deletate (Schmidt și colab., 1995), posibil ca o consecință a ratelor evolutive diferite de amplificare a secvențelor sau de identificare a siturilor de inserție (Heslop-Harrison și colab., 1997). Secvențele repetitive simple sau microsateliții sunt dispersate și prezente în clusteri, precum și sub formă circulară, în cadrul blocurilor de repetiții mari în tandem (Schmidt și Heslop-Harrison, 1996). Genele ARNr 18S-5.8S-25S sunt aglomerate în una sau mai multe perechi de cromozomi din genom. Marea majoritate a cromozomilor la plante prezintă o secvență nucleotidică telomerică de 7 pb (Richards și colab., 1993). În cadrul genomului, toți cromozomii prezintă o compoziție și o organizare relativ similară a repetițiilor (Schwarzacher și colab., 1997), datorită omogenizării genomului, deși numărul copiilor repetițiilor individuale poate varia de la un cromozom la altul.

Această organizare genomică este valabilă atât pentru plantele cu genomuri mai mici, cât și pentru cele cu genomuri mai mari, diploide sau poliploide. Aglomerarea genelor favorizează strategiile de izolare în vederea cartării genice, iar mozaicul secvențelor repetitive furnizează puncte de referință pentru cartarea și ordonarea genelor, ca și pentru localizarea transgenelor sau pentru caracterizarea situsurilor de recombinare.

La sfecla de zahăr, unde ADN-ul cromozomul are 180 Mpb, sunt prezente toate elementele genomice menționate. Grâul, orzul și ovăzul, deși au cromozomi de 10 ori mai mari, prezintă același model. Au fost identificate familii de repetiții în tandem (Endo și Gill, 1996; Vershinin și Heslop-Harrison, 1998), și alte clase de secvență cu localizare caracteristică. La plantele cu genomuri mici, precum *Arabidopsis* (15 – 30 Mpb), nu sunt cunoscute repetițiile intercalare majore (Brandes și colab., 1997). ADN-ul repetitiv în tandem este aglomerat în jurul centromerului, iar retrotranspozonii sunt mult mai dispersați (Heslop-Harrison și colab., 1997; Brandes, 1997).

Genele nu sunt uniform distribuite în cromozom, ci sunt localizate în clusteri între unul sau mai multe blocuri repetitive diferite, frecvent predominând spre capetele cromozomilor. Analizele de deleție genică efectuate la 426 linii de grâu, au arătat că genele sunt aglomerate în 1–4 grupuri, de-a lungul fiecărui braț cromozomal (Endo și Gill, 1996), ceea ce coincide cu datele obținute prin cartarea translocațiilor dintre grâu și speciile înrudite (Castilho și colab., 1997).

2. GENOMUL OREZULUI

Orezul reprezintă o treime din cerealele de bază pentru hrana omenirii. Orezul este originar din China, iar excavațiile făcute la relicvele *Hemudu*, din povincia *Zhejiang* au dat la iveală orez fosilizat, datând de cca. 7.000 ani. Aproximativ 11% din terenul arabil al lumii este utilizat pentru cultivarea orezului, iar cca. 29% din producția totală de cereale a anului 2000 a constat din orez. Înțelegerea funcționării genelor la orez va permite elucidarea genomurilor mult mai complexe ale porumbului și grâului.

Orezul, *Oryza sativa*, are două tulpini principale, care au suferit divergența acum 2–3 milioane de ani: *indica*, adaptată să crească la tropice, și *japonica*, care crește în regiunile temperate.

Cei 12 cromozomi ai orezului au dimensiuni cuprinse între 50 și 25 Mb. Ei se colorează bine în albastru, cu *DAPI* (4',6–diamidino-2–fenilindol). Nucleolul și *NOR*, conținând repetiții ale genei ARNr într-un cluster în cromozomul 9, sunt colorați în roșu. Centromerii sunt colorați în verde, în urma marcajului specific al repetiției satelite centromerice *RCS2* (fig. 2).

Prin inginerie genetică, exprimarea precursorilor vitaminei A a dus la îmbunătățirea calităților nutriționale ale bobului. Îmbunătățirea rezistenței intrinseci a orezului la anumite boli poate reduce impactul ecologic al utilizării pesticidelor, iar creșterea plantelor tolerante la secetă sau la salinitate determină îmbunătățirea recoltei.

Genomul orezului este cel mai mic genom dintre cele ale plantelor de cultură comune și a evoluat prin inversii, translocații și elemente transpozabile. În figura 3 este prezentat comparativ genomul orezului cu cel al porumbului și orzului. Fiecare cerc reprezintă o specie, cu cromozomii dispuși cap-la-cap. Sunt ilustrați câtiva loci genici asociați unor caracteristici particulare, cu scopul de a arăta similitudinea unor gene în porțiuni genomice similare plantelor ilustrate. Alte cereale care prezintă

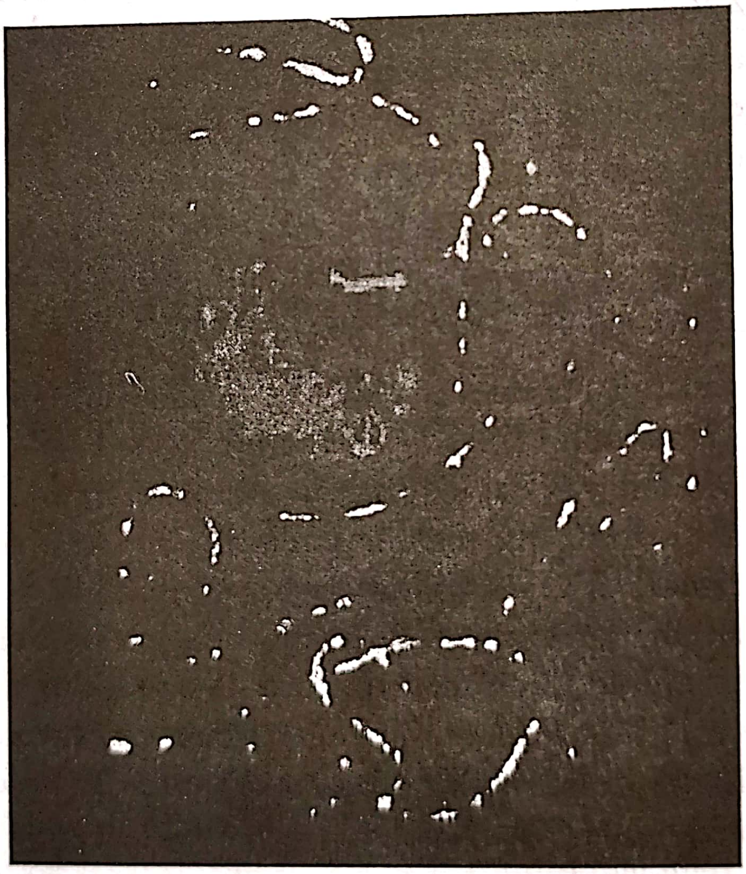


Fig. 2 — Evidențierea cromozomilor la orez prin marcaj *DAPI* *(4', 6-diamidino-2-fenilindol)* (*Science*, 2002)

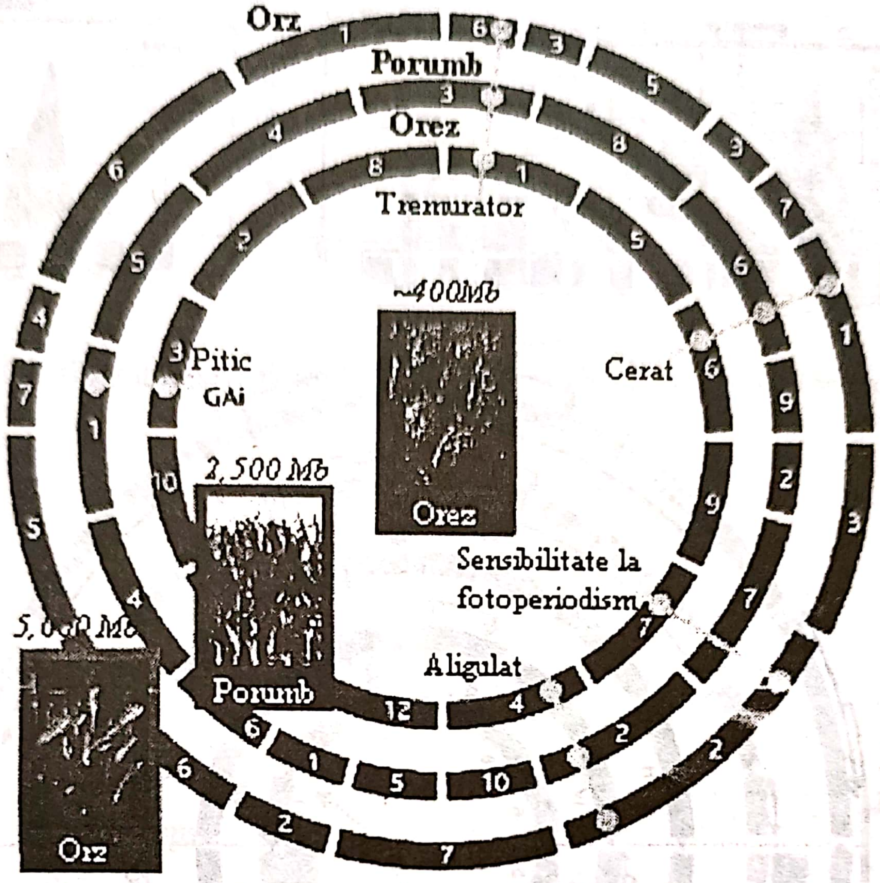

Orz
Porumb
Orez
Tremurator
~400Mb
Pitic
GAi
Cerat
2,500 Mb
Orez
Sensibilitate la
fotoperiodism
5,000 Mb
Aligulat
Porumb
Orz

Fig. 3 — Comparație între genomurile orezului, porumbului și orzului (*Science*, 2002)

colinearitate cu orezul sunt grâul, ovăzul, sorgul și trestia de zahăr. În figura 4 sunt prezentate relațiile genomice la nivel de hartă între orez, mei, sorg și porumb.

Linearitatea evolutivă a orezului și a plantei *Arabidopsis* a suferit procesul de divergență aproximativ acum 200 de milioane de ani. Deși genomurile celor două plante nu prezintă grad ridicat de sintenie, există similitudini între multe proteine codificate. Genele orezului au suferit divergența din *Arabidopsis*, în ceea ce privește conținutul în GC, utilizarea codonilor și a aminoacizilor. Conținutul în GC al genelor la orez prezintă un gradient neîntâlnit la genele de la *Arabidopsis*, capătul 5' fiind cu 25% mai bogat în GC, comparativ cu capătul 3'. Figura 5 prezintă conținutul în GC al genomurilor de *Arabidopsis*, orez și om, iar figura 6 indică clasificarea funcțională a genelor la orez, conform Consorțiului Ontologic al Genelor, și gradul de omologie cu genele de la *Arabidopsis*.

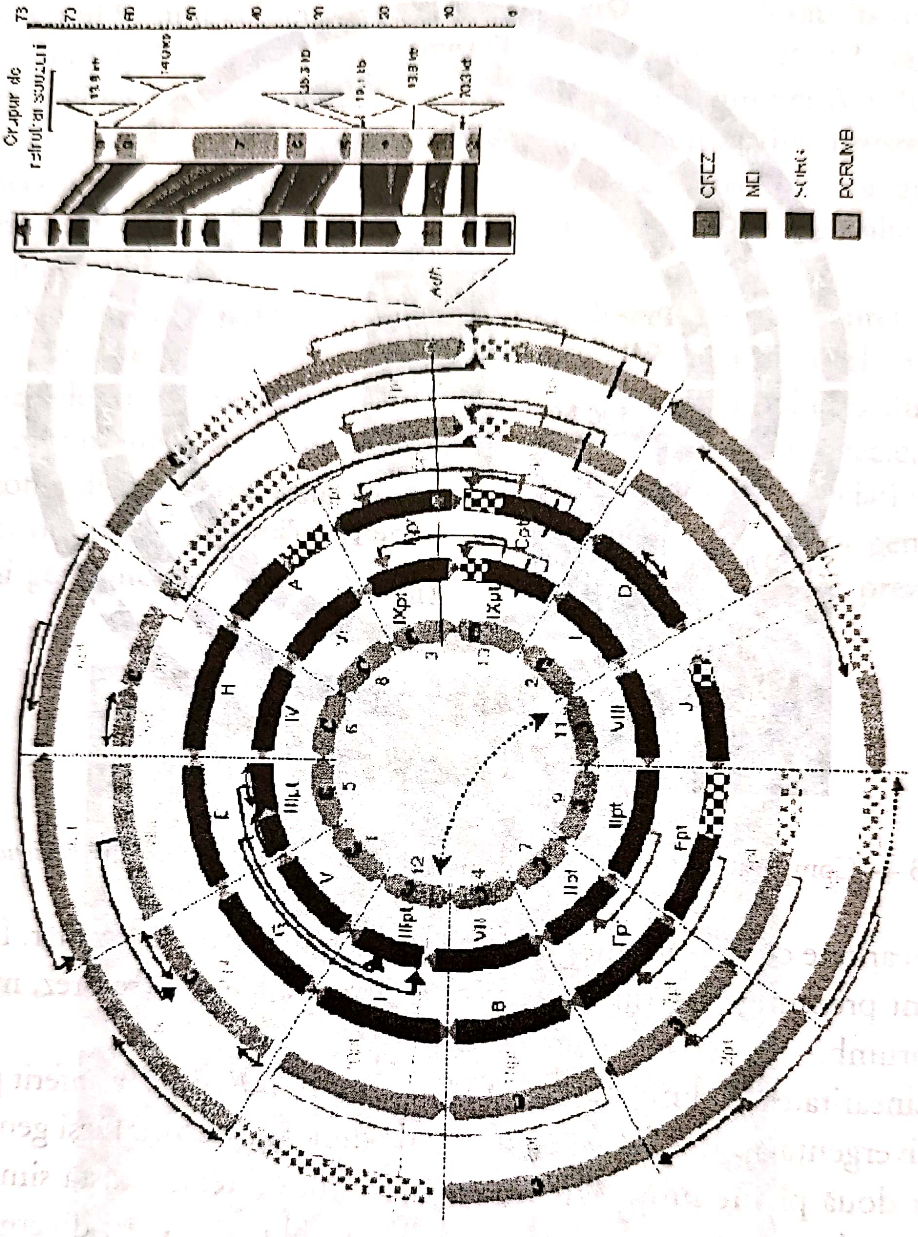

OREZ
MEI
SORG
PORUMB
Adh
A
B
C
D
E
F
G
H
I
J
IXpt
IIIpt
VIII
IV
V
VII
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12

Fig. 4 — Relațiile genomice la nivel de hartă între orez, mei, sorg și porumb. Săgețile indică rearanjări; săgețile roșii indică rearanjări care sunt comune speciilor dintr-un grup taxonomic; C – pozițiile centromerului; cercurile roz, localizarea genelor *Adh* ortoloage la sorg și porumb. În detaliu este indicată comparația dintre regiunile *Adh* ortoloage la sorg (verde) și porumb (galben) la nivel de secvență ADN; săgețile indică localizarea și presupusa orientare transcripțională a genelor identificate; secvențele conservate la sorg și porumb sunt conectate prin umbre gri (din Encyclopaedia of Genetics, vol. 2, editori: S. Brenner și J.H. Miller, Academic Press, 2002).

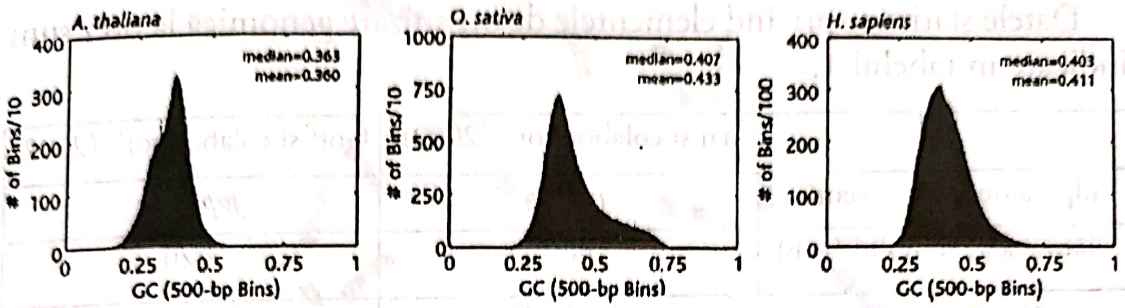


Fig. 5 — Conținutul în GC al genomurilor de *Arabidopsis*, orez și om (*Science*, 2002).

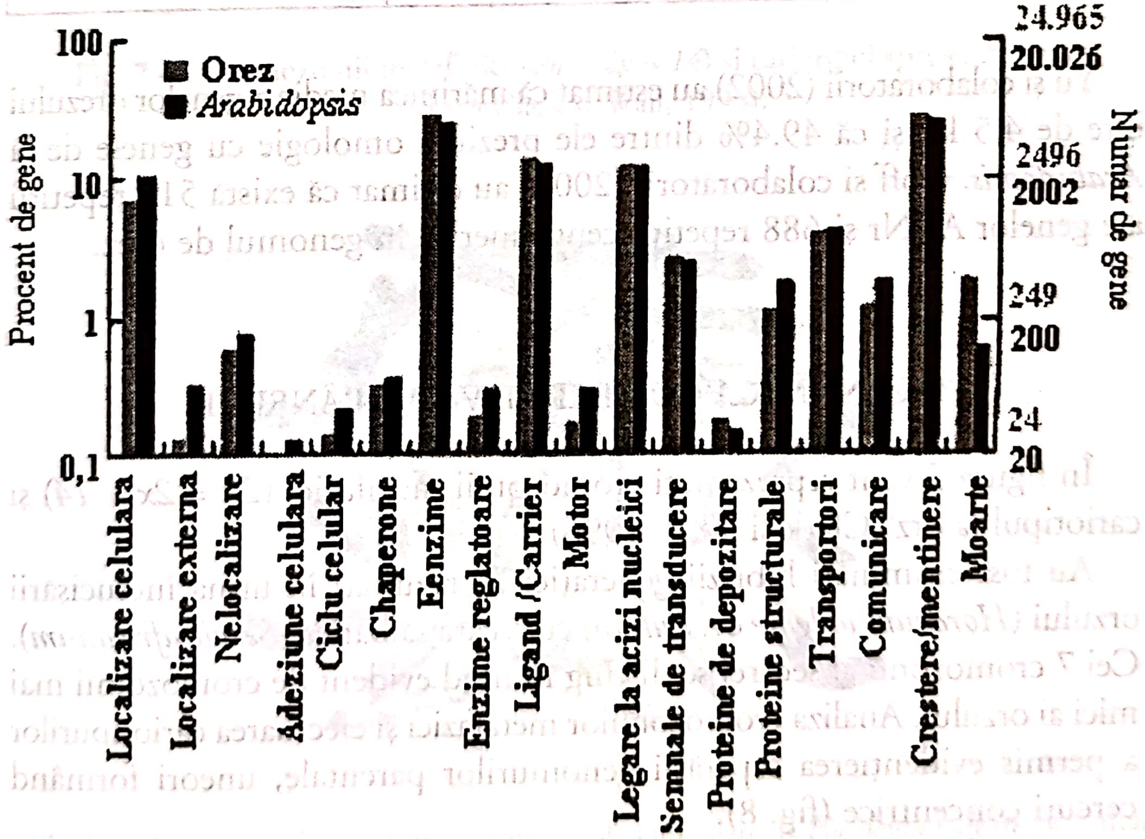


Fig. 6 — Clasificarea funcțională a genelor la orez conform Consorțiului Ontologic al Genelor, și gradul de omologie cu genele de la *Arabidopsis*. (*Science*, 2002).

Datele statistice privind elementele de organizare genomică la orez sunt indicate în tabelul 1.

	Yu și colaboratorii (2002)	Goff și colaboratorii (2002)
Tulpina de orez secvențiată	*indica*	*japonica*
Mărimea genomului (Mb)	466	420
Număr de gene	46–56 K	32–50 K
Gene duplicate (%)	74	77
Număr de elemente transpozabile	> 24.9%±	4,220
Număr de repetiții simple	1.7%±	46,666
Test de calitate:		
Acoperire *shotgun*	4.2x	> 6x
Număr de contingente	127,550	42,109

Yu și colaboratorii (2002) au estimat că mărimea medie a genelor orezului este de 4.5 kb și că 49.4% dintre ele prezintă omologie cu genele de la *Arabidopsis*. Goff și colaboratorii (2002) au estimat că există 513 repetiții ale genelor ARNr și 688 repetiții centromerice în genomul de orez.

3. GENOMICA COMPARATIVĂ A GRÂNELOR

În figura 7 sunt reprezentați cromozomii metafazici ($2n = 2x = 14$) și cariotipul la orz (Clark și Wall, 1996).

Au fost examinați hibrizii generației F_1 rezultați în urma încrucișării orzului (*Hordeum vulgare* cv. *Sultan*) cu secara sălbatică (*Secale africanum*). Cei 7 cromozomi ai secarei se disting în mod evident de cromozomii mai mici ai orzului. Analiza cromozomilor metafazici și efectuarea cariotipurilor a permis evidențierea separării genomurilor parentale, uneori formând cercuri concentrice (fig. 8).

Analizele genomice comparative au relevat conservarea ordinii genelor, respectiv conservarea sinteniei sau colinearității genelor pentru toate familiile taxonomice. La porumb, orez și sorg, secvența și ordinea genelor sunt înalt

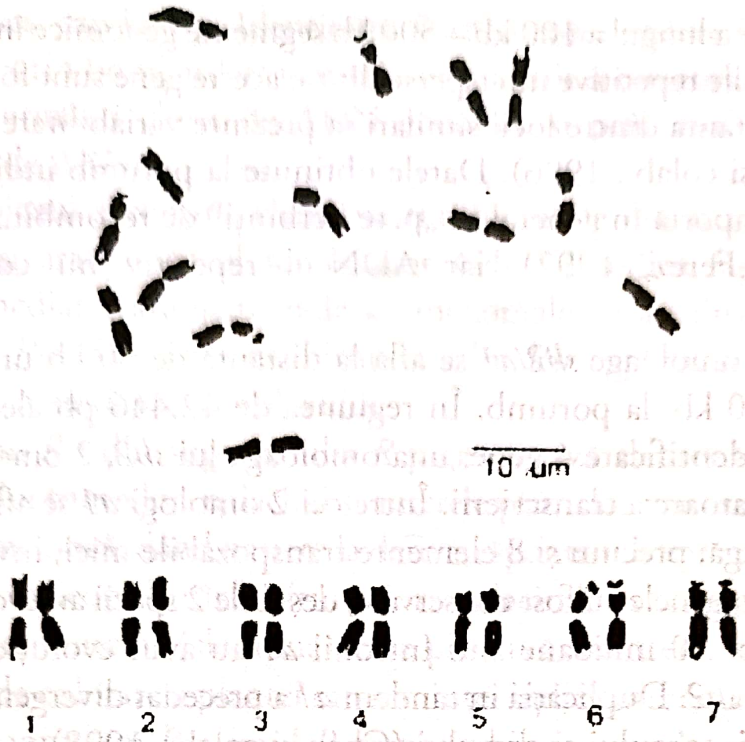


Fig. 7 — Cromozomii metafazici (*2n = 2x = 14*) și cariotipul speciei *Hordeum* (după Clark și Wall, 1996).

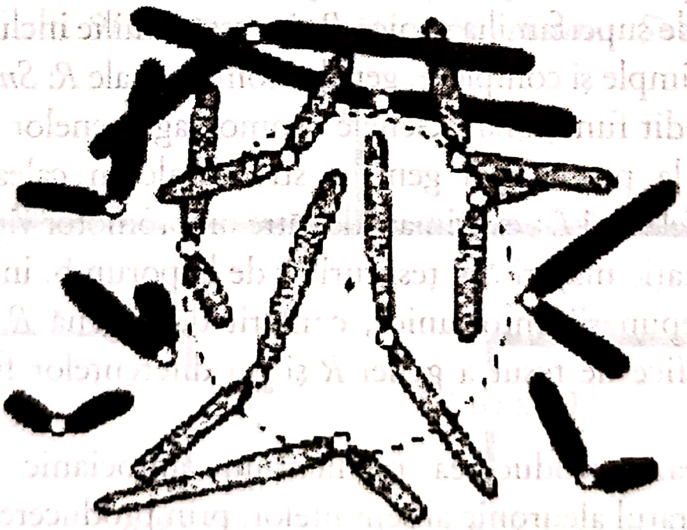


Fig. 8 — Cromozomii metafazici ai unei celule radiculare de *Hordeum vulgare* cv. Sultan (cromozomii punctați) x *Secale africanum* (cromozomii negri) indică izolarea spațială a celor două seturi de cromozomi și păstrarea organizării genomice a fiecărei specii participante la formarea hibridului (după Bennett, 1988).

conservate de-a lungul a 100 kb – 500 kb segmente genomice în clone *YAC*, însă ADN-urile repetitive intersperse dintre aceste gene sunt foarte diferite, făcând ca distanța dintre locii similari să prezinte variabilitate foarte mare (SanMiguel și colab., 1996). Datele obtinute la porumb indică faptul că genele se comportă în general ca „pete fierbinți“ de recombinare (Dooner și Martinez-Ferez, 1997), iar ADN-ul repetitiv nu contribuie la recombinare.

Regiunile omoloage *sh2/a1* se află la distanță de 30 kb una de alta, la orez, și la 140 kb, la porumb. În regiunea de 42.446 pb ale ADN de la sorg au fost identificate 4 gene: una omoloagă lui *sh2*, 2 omoloage lui *a1* și o genă reglatoare a transcrierii. Între cei 2 omologi *a1* se află o repetiție terminală lungă, precum și 8 elemente transpozabile mici, invers repetate. La sorg și orez, genele au fost conservate, deși cele 2 specii au evoluat separat, în cursul celor 50 milioane ani. Intronii *a1* au avut evoluție mai rapidă decât intronii *sh2*. Duplicația în tandem *a1* a precedat divergența ancestrală a porumbului, sorgului și orezului (Chen și colab., 1998).

Sorgul are un complement haploid format din 10 cromozomi, dar 13 grupe de lincage. Fragmentele mici *K, L* și *M* sunt probabil regiuni aparținând altor grupe, care nu au fost cartate până în prezent.

La porumb, pattern-ul specific de depozitare în țesuturi a antocianinei este determinat de superfamilia genică *R*. Această familie include un număr mare de alele *R* simple și complexe, genele cromozomale *R*: *Sn* și *Lc* și alelele locusului *B* înrudit funcțional. Genele *R* omoloage genelor *myc* activează transcrierea de la promotorii genelor structurale în calea biosintetică antocianică. Genele *B* și *Lc*, exprimate de către un promotor viral constitutiv, conferă pigmentație majorității țesuturilor de la porumb, indicând faptul că pattern-ul depunerii antocianice, conferit de o genă *R*, se datorează exprimării specifice de țesut a genei *R* și nu diferențelor funcționale în proteinele *R*.

R-r controlează producerea pigmentului antocianic în țesuturile plantelor și în stratul aleuronic al semințelor, prin producerea unei familii de proteine transcripționale activatoare. Complexul *R-r* conține o serie de componente repetate, omoloage, aranjate în tandem direct și invers: componenta *P* - o genă *R* simplă ce conferă pigmentația și subcomplexul *S* — format dintr-o genă *R* trunchiată inactivă, *q* și din 2 gene *R*, funcționale, *S1* și *S2*, care pigmentează aleurona. Genele *S1* și *S2* au aranjare specială, de tip inversat, cap-la-cap. Identitatea fiecărei componente funcționale a fost stabilită prin bombardarea cu microproiectile a țesuturilor intacte de porumb, conținând clone de ADN genomic și prin analiza *in vivo* a populațiilor de ARNm.

Subcomplexul *S* conține elemente transpozabile din familia *CACTA*. Localizarea și aranjamentul secvențelor *CACTA* indică faptul că acest element a mediat rearanjamentele cromozomale ce au dus la formarea complexului *R-r*. Structura neobișnuită a lui *R-r* explică, în mare parte, instabilitatea meiotică a complexului.

Complexul *R-r* din superfamilia *R* pigmentează aleurona, coleoptilul, vârful lăstarului frunzelor, rădăcinii și anterele plantelor mature. *R-r* prezintă instabilitate meiotică, dând naștere la derivați spontani la care toată pigmentația plantei (coleoptil, vârful frunzelor, rădăcinile și anterele) sau toată pigmentația semințelor (aleuronă), este pierdută. Pierderea independentă a capacității de colorare a plantei sau seminței indică prezența a 2 elemente genetice în complexul *R-r*, unul *P*, responsabil pentru plantă și celălalt *S*, pentru pigmentația seminței și care se comportă ca o duplicație în tandem. Crossing-over-ul inegal dintre *P* și *S* are drept rezultat pierderea unui membru din duplicație. Frecvența derivaților *R-r* este de 6.2 x 10^{-4}: aproximativ 1/10 sunt derivați ce au pierdut *P*= *R-g* (*R*=aleurona colorată; *-g* = planta verde), iar ceilalți 9/10 sunt derivați ce au pierdut *S*=*r-r*/*r* = aleurona

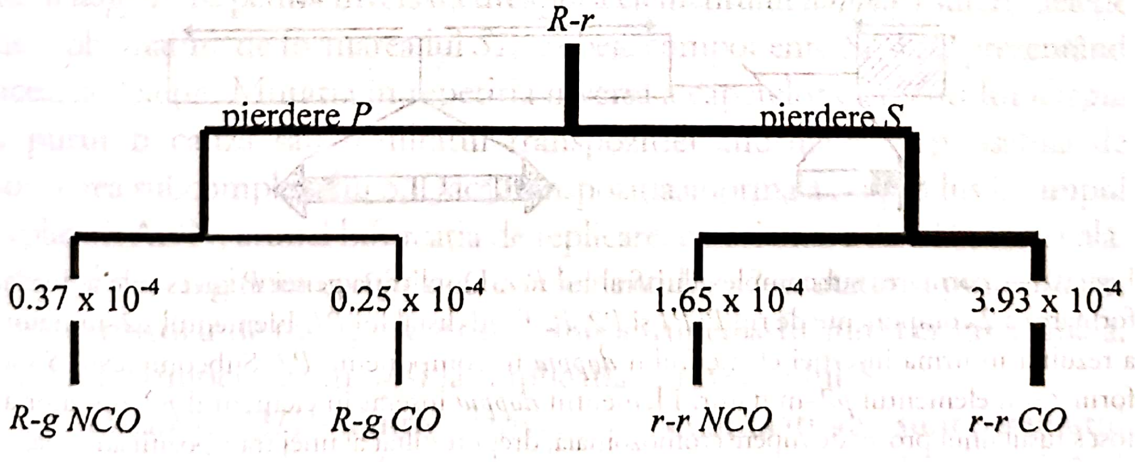


Fig. 9 — Instabilitatea meiotică a complexului *R-r*. Complexul *R-r* dă naștere la alele derivate *R-g* (fără *P*) și *r-r* (fără *S*) prin crossing-over, alele de crossover (CO), sau printr-un alt mecanism, alele de non-crossover. Grosimea liniilor indică frecvența relativă a fiecărui derivat (după Walker și colab., 1995).

necolorată; -*r* = planta roșie). Frecvența derivaților apăruți prin crossover este de 3.93 x 10^{-4}, pentru *r-r*, și de 0.25 x 10^{-4}, pentru *R-g* (fig. 10).

Complexul *R-r* conține 3 gene funcționale *P*, *S1* și *S2* și un fragment genic nefuncțional *q*, aranjate structural ca *P-q-S1–S2*. Elementul *q* nu

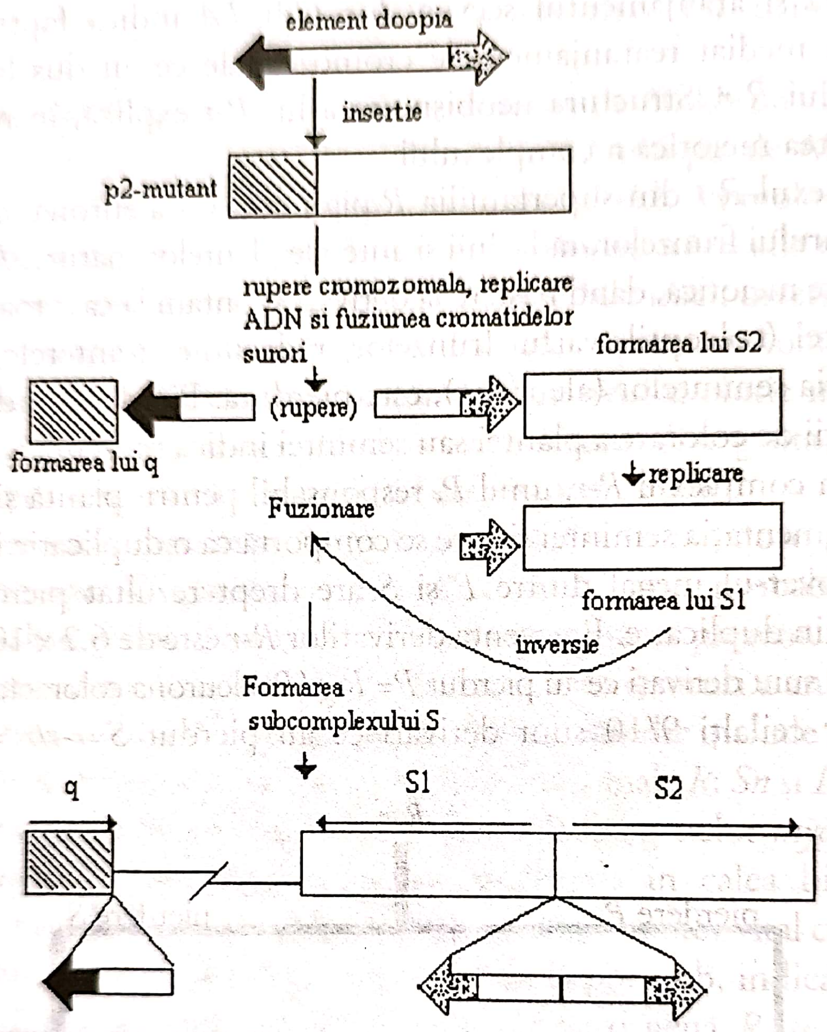

element doopia
insertie
p2-mutant
rupere cromozomala, replicare ADN si fuziunea cromatidelor surori
(rupere)
formarea lui S2
formarea lui q
replicare
Fuzionare
formarea lui S1
inversie
Formarea subcomplexului S
q
S1
S2

Fig. 10 — Formarea subcomplexului *S* al lui *R-r*. Duplicația genei *P* ancestrale a dus la formarea a 2 componente de tip *P*: *P1* și *P2*, *P2* fiind distal lui *P1*. Elementul *p2*–mutator a rezultat în urma inserției elementului *doppia* în componenta *P2*. Subcomplexul *S* s-a format din elementul *p2*–mutator. Elementul *doppia* inserat în elementul *p2*–mutator a fost situsul unui proces de rupere cromozomală, drept rezultat al unei transpoziții anormale. Ruperea a dus la separarea capetelor 5' și 3' ale elementului *p2*–mutator, cu formarea componentelor *q* și *S*. Fuziunea cromatidelor surori a dus la formarea regiunii delta între cele 2 gene *S*, cu repararea ulterioară a fragmentului cromozomal fuzionat cu *q* și cu genele *S* duplicate pe o distanță de 10 kb. Secvențele *doppia* care nu au participat la aceste procese sunt indicate prin săgeți deschise și închise la culoare (după Walker și colab., 1995).

prezintă omologie de secvență cu niciuna din genele *S*, de aceea nu are loc crossing-over-ul inegal între genele *q* și *S*. Un crossover intracromozomal între *P* și *S1* nu produce modificări în pattern-ul depunerii antocianinei în plante și nu poate fi detectat, deși regiunea de intercalare dintre *P* și *S1* a lui *q* este inversată. Crossover-ul intercromozomal între *S1* și *S2* sau *P* duce la apariția unui cromozom dicentric și a unui fragment acentric. Producerea dicentricilor inițiază un ciclu de rupere-fuziune (BFB) ce este observat la descendenții aleuronici. Semințele cu fenotipuri *R*– indicatoare ale unui ciclu BFB sunt rare, iar crossing-over-ul intercromozomal între elementele inversate nu este frecvent.

Formarea complexului *R-r* a cuprins 3 etape: o genă *R* ancestrală simplă (*P*-ancestrală) a suferit duplicație, în urma crossing-over-ului dintre segmentele duplicate din afara genei *R*. Distanța dintre *P* și subcomplexul *S* reprezintă lungimea acestei duplicații inițiale din cea de a doua etapă, în care elementul *doppia* s-a mutat în partea distală a copiei genice, rezultând un component intermediar, *p2*–mutator (fig. 9). În ultima etapă, o transpoziție anormală a dus la ruperea elementului *p2*–mutator, cu generarea subcomplexului *S*.

Ruperea cromozomală, replicarea și fuziunea cromatidelor indicate în fig. 9 pot să nu fi avut loc în această ordine. De exemplu, este posibil să fi avut loc toate trei deodată, în timpul transpoziției anormale a elementului *doppia*. Repetiția inversată dreapta a elementului *doppia* a suferit deleție de 5 pb, înainte de formarea lui *S1*, ambele componente *S1* și *S2* prezentând această deleție. Mutația în repetiția inversă a capetelor elementului *doppia* a putut fi cauza sau rezultatul transpoziției anormale, responsabilă de formarea subcomplexului *S*. Dacă transpoziția anormală s-a produs în timpul replicării ADN, atunci bifurcația de replicare, cu orientare distală-proximală, trecând prin regiunea codificatoare a elementului *p2*–mutator, a putut întâlni un intermediar de transpoziție care a inițiat ruperea-fuziunea cromozomală, ducând la înlocuirea lui *q* și la duplicația și inversia lui *S*.

Aproximativ 3/10 dintre derivații *r-r* examinați nu sunt rezultatul crossing-over-ului dintre *P* și *S2* și se comportă genetic ca și *P*-urile, reținând structura duplicată și componenta *S* nefuncțională. Fiecare derivat *P* a suferit o deleție cuprinzând regiunea sigma. Menținerea duplicației genice în derivații *r-r NCO* este corelată cu pierderea regiunii sigma dintre *S1* și *S2*. Secvențierea alelei *r-r N1–3–1*, având deletată regiunea sigma, a indicat că această regiune funcționează drept promotor pentru genele *S1* și *S2* (Walker și colab., 1995).

Linia *Oh43* de porumb prezintă 3 gene ale poliubiquitinei: *MubG1*, *MubG5* și *MubG9*. Gena *MubG1* este localizată în poziția 104, pe cromozomul 5L și prezintă 7 repetiții, gena *MubG5* pe 4L188 și conține 5 repetiții, iar *MubG9* pe 4L186 și are 5 repetiții (Liu și colab., 1995).

Genomul nuclear al porumbului conține gena ARNt (Lys) (CUU) lincată cu gena feritinei *ZmFer2*. Gena ARNt (Lys) aparține unei familii multigenice, nu conține niciun intron și prezintă elemente reglatoare intragenice comune genelor ARNt de la eucariote (cutiile A și B). Capetele 5' și 3' prezintă caracteristici ale ARNt nucleare. Secvența ARNt este identică secvenței ARNt citoplasmatic (Lys) (CUU) din embrionul de grâu. Analiza RT-PCR a relevat faptul că gena ARNt (Lys) se exprimă *in vivo* la porumb și la tutunul transgenic (Fobis-Loisy și Briat, 1996).

Trei gene reglatoare ale auxinei din protoplaști: *parA*, *parB* și *parC* intervin în ciclul celular al tutunului: *parA* conține 20 aminoacizi și prezintă omologie de secvență cu o genă reglatoare a auxinei din soia. Produsul genei *parA* are rol în reglarea transcripției la plante, fiind asociată cu ARN-polimeraza II. Produsul genei *parB* conține 213 aminoacizi și prezintă omologie cu S-glutation-transferaza III de la porumb. Produsul genei *parB* are rol în detoxificarea xenobionților electrofili, prin catalizarea conjugării cu glutation. Dacă produșii genei *parA* au localizare nucleară, cei ai genei *parB* se găsesc în membranele plasmatice și citoplasmatice, fapt demonstrat prin microscopia cu fluorescență, după colorarea cu anticorpi anti- *parB*. Produșii genelor *parC* și *parA* sunt omologi, gena *parC* conținând 221 aminoacizi. Familia genică *parA* mai cuprinde gena *Prp1*, de la cartof, două gene *103* și *107*, de la linii cultivate de tutun, precum și gena *Gmnsp26–A*, de la soia. *Gmnsp26–A* reacționează la auxine, gena *Prp1* este activată la cartof, în urma infecției cu *Phytophtora infestans*, în timp ce genele *103* și *107* sunt reglate de auxină. Toate genele familiei *parA* au rol în reglarea transcrierii, răspunzând la diferite semnale externe și interne. Palme și Schell (1991) au demonstrat omologia de structură dintre o proteină de legare a auxinei din membrana plasmatică de la *Arabidopsis thaliana* și produsul genei *parB* (Nagata și Takahashi, 1992).

Variațiile în organizarea structurală a cromatinei, corelate cu gradul de hidratare al țesuturilor, modifică gradul de compactizare al ADN, având efect și asupra celorlalte activități celulare. Rearanjamentele structurale ale cromatinei nucleare se datoresc hidratării cu apă și rearanjării proteinelor. Ele preced reacțiile metabolice ale moleculelor de ADN. Modificarea organizării structurale a cromatinei este foarte importantă pentru trecerea celulelor din starea de latență, în starea activă.

Identificarea proteinelor cu rol funcțional în tranziția de la starea celulară de latență la proliferare facilitează elucidarea mecanismelor de reglare a genelor. Proteinele structurale nucleare și enzimele implicate în metabolismul ADN au rol important în gradul de condensare al cromatinei, care este foarte ridicat în embrionii în stare uscată, scăzând o data cu imbibiția care se produce în prima fază de germinație. Nonhistona nucleară *QP47* are rol structural similar lui *H1*, fiind conservată la leguminoase (*Vicia faba* și *Cicer arientinum*), dar lipsind la *Zea mays*. QP47 protejează molecula de ADN în timpul deshidratării, prin creșterea gradului său de compactizare, concentrația QP47 crescând în timpul maturării semințelor.

După hidratarea nucleilor și modificările organizării structurale a cromatinei, ieșirea celulelor din starea de latețǎ implică activarea enzimelor cu rol în metabolismul ADN. În timpul maturării semințelor, deshidratarea cromatinei determină ruperi în molecula de ADN. Aceste ruperi trebuiesc reparate înainte de restabilirea activității metabolice a ADN și de ieșirea celulelor din starea lor de latență. În primele 72 de ore de la germinare, în rădăcinile de *Pisum sativum* crește gradul de fosforilare al ADN topoizomerazei I, enzima implicată în repararea ADN (Chiatante, 1992).

4. UTILIZAREA EFECTULUI STATMOKINETIC AL COLCHICINEI LA PORUMB

La multe specii de plante, dublarea numărului de cromozomi se poate realiza prin utilizarea unui tratament cu un agent antimitotic al plantulelor haploide, derivate din antere. Colchicina induce dublarea numărului de cromozomi numai în anumite celule, datorită asincroniei diviziunilor celulare și determină apariția de plante himere. Pentru speciile de plante cu flori bisexuate și cu lăstari sau ramuri, himerele sunt acceptate, deoarece unii lăstari sau ramuri se pot dezvolta din celule cu număr dublu de cromozomi. În contrast, plantele de porumb nu produc de obicei lăstari și linii celulare care dau naștere la paniculi și la spice deja determinate în boabele mature. Tratamentul cu colchicină a boabelor sau plantulelor de porumb poate dubla numărul de cromozomi în panicul sau lăstar, dar de regulă nu în amîndouă, ceea ce face imposibilă autopolenizarea. Prin urmare, eficiența inducerii plantelor dublu-haploide de porumb este foarte scăzută în urma tratamentului cu colchicină a plantulelor haploide regenerate.

Tehnica de dublare a numărului de cromozomi a implicat tratamentul cu colchicină a unei linii de calus embrionar haploid de porumb (*Zea mays* L.), derivat prin cultura de antere. Au fost utilizate două concentrații de colchicină (0.025% și 0.05%) și trei timpi de tratament (24, 48 și 72 de ore), alături de probe martor. S-a determinat numărul de cromozomi, precum și numărul de semințe provenite din plante regenerate. Probele martor nu au dat naștere la plante dublu-haploide.

După 24 de ore de la tratamentul cu colchicină, calusul de porumb a dat naștere la cca. 50% plante dublu-haploide. Toate plantele regenerate din calusul tratat cu colchicină, timp de 72 de ore, au fost dublu-haploide, cu excepția câtorva plante tetraploide. Nu s-au înregistrat diferențe semnificative între cele două concentrații de colchicină utilizate în scopul dublării numărului de cromozomi. Majoritatea plantelor dublu-haploide au produs polen fertil, iar 107 din cele 136 de plante dublu-haploide au generat 1 — 256 boabe per știulete, după autopolenizare. Tratamentul cu colchicină al calusului haploid de porumb reprezintă o metodă foarte eficientă de obținere a plantelor dublu-haploide prin cultura de antere (tabelul 2).

Toate cele 24 de plante de porumb regenerate din calusul netratat au conținut numărul haploid de cromozomi (n=10) (tabelul 3, fig. 10a). Din cele 96 de plante regenerate din calusul tratat timp de 24 de ore cu colchicină în concentrație de 0.025% sau de 0.05%, 49 de plante au fost diploide (2n=20) (fig. 10b), iar celelalte 47 de plante au fost haploide, cu numai 10 cromozomi. 29 dintre cele 53 de plante rezultate din calusul tratat cu colchicină timp de 48 de ore, au fost diploide. Calusul tratat timp de 72 de ore cu colchicină nu a dat naștere la nici o plantă haploidă, marea majoritate a plantelor regenerate fiind diploide, cu excepția uneia și respectiv a patru plante tetraploide, cu 40 de cromozomi, obținute prin cele două tratamente de 72 de ore, cu colchicină în concentrație de 0.025% și respectiv de 0.05%.

Tabelul 2. Ploidia plantelor de porumb regenerate din calus haploid tratat cu colchicină, prin metoda squash a radicelelor.

Tratament cu colchicină		Ore	Număr de plante regenerate		
Ore	Concentrație	Total	Haploide	Diploide	Tetraploide
-	-	24	24	0	0
24	0.025%	48	23	25	0
	0.05%	48	24	24	0
	-	-	-	-	
Total		96	47	49	0
48	0.025%	22	8	14	0
	0.05%	31	16	15	0
	-	-	-	-	
Total		53	24	29	0
72	0.025%	31	0	30	1
	0.05%	32	0	28	4
Total		63	0	58	0

Toate plantele haploide regenerate au prezentat o morfologie caracteristică: frunze scurte și înguste, vigoare redusă, polen care nu cade. În aceleași condiții de cultură, plantele dublu-haploide au fost mai viguroase și au prezentat creștere mai rapidă comparativ cu plantele haploide. Plantele dublu-haploide rezultate prin tratamente diferite au prezentat morfologie similară. Majoritatea au produs polen viabil și abundent. O caracteristică comună a majorității plantelor dublu-haploide a fost apariția paniculelor la florile femele. Spicele acestor plante puteau fi autopolenizate, dacă mătasea apărea la timp. Din cele 29 de plante dublu-haploide care nu au produs boabe, 21 de plante nu au putut fi polenizate, datorită asincroniei dintre apariția polenului și cea a mătăsii, lipsei dezvoltării știuleților sau creșterii reduse. Celelalte 8 plante nu au produs boabe, nici după ce au fost polenizate o dată sau de două ori, în zile succesive. Sincronia apariției polenului și a mătăsii au fost factorii principali care au afectat producția de boabe a

Tabelul 3. Relația dintre întârzierea apariției mătăsii după începerea căderii polenului și numărul mediu de boabe produse per știulete de către 33 de plante dublu-haploide, randomic alese.

Întârzierea apariției mătăsii (zile)	Număr de plante polenizate (*)	Număr mediu de boabe per știulete	Număr de știuleți fără boabe
1	4	100.3	0
2	8	91.0	0
3	8	87.1	0
4	5	39.0	0
:5	8	2.5	5

* Un știulete per plantă de porumb a suferit autopolenizare.

plantelor dublu-haploide. Așa cum se arată în tabelul 2, dacă mătasea a apărut cu 1–3 zile mai târziu față de apariția primelor grăuncioare de polen, știuletele a avut aproximativ 87 de boabe. Dacă polenizarea a început 4 zile mai târziu, față de acest eveniment, numărul boabelor per știulete a fost de doar 39. Dacă apariția mătăsii s-a produs la 5 zile după apariția primelor grăuncioare de polen, majoritatea plantelor nu au mai produs boabe.

După tratamentul cu colchicină, timp de 73 de ore, au rezultat 5 plante tetraploide: două cu știuleți terminali și trei cu polen viabil, dar datorită apariției întârziate a mătăsii, numai două dintre plante au generat câte un bob fiecare, în urma autopolenizării.

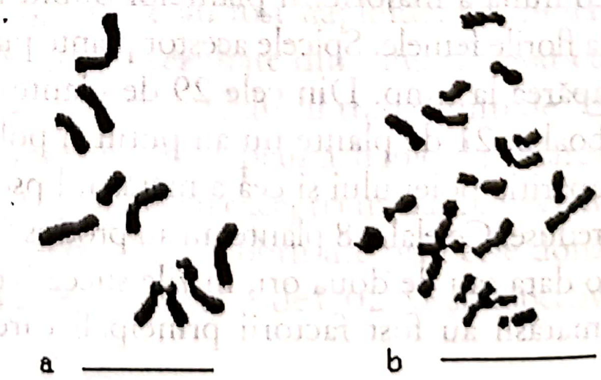


Fig. 11 a și b — Cromozomii din radicelele de porumb dintr-o celulă haploidă cu 10 cromozomi, aparținând unei plante regenerate dintr-un calus netratat *(a)* și dintr-o celulă diploidă cu 20 de cromozomi aparținând unei plante regenerate dintr-un calus tratat cu colchicină *(b)*. Linia reprezintă 10 µm (după Wan și colab., 1989).

Metoda este rapidă pentru că necesită doar 6 luni de la tratamentul cu colchicină a calusurilor, până la recoltarea știuleților proveniți din plantele regenerate dublu-haploide. Este necesar un tratament de peste 48 de ore pentru a se obține cât mai multe plante dublu-haploide. Tratamentul de 72 de ore duce la apariția plantelor tetraploide, ceea ce nu este indicat.

Plantele dublu-haploide nu au produs boabe, din cauza apariției întârziate a mătăsii și lipsei formării știuleților — fenomene frecvent întâlnite la plantele de porumb, regenerate din calus. Plantele anormale, găsite printre cele regenerate, au apărut probabil din cauza condițiilor de cultură tisulară mai degrabă decât datorită tratamentului cu colchicină, de vreme ce aceleași anomalii (creștere întârziată, spic terminal, absența știuletelui normal) au fost găsite și printre plantele provenite din calus netratat (Wan și colab., 1989).

Anumite trăsături de bază ale genomurilor plantelor diferă de cele ale animalelor. De exemplu, poliploidia și introgresia sunt foarte răspândite la plante, dar nu au rol semnificativ în evoluția genomului la mamifere. La nivelul organizării cromozomale, plantele nu prezintă benzi G sau R, care sunt o consecință a compoziției și respectiv a funcției diferite a ADN-ului (Holmquist, 1992) la cromozomii mamiferelor. În fuziunea celulară, la mamifere, și la hibrizii interspecifici ai plantelor (Schwarzacher, 1989), ADN-ul genomic total al unei specii parentale (sau ancestrale) poate fi marcat și folosit pentru hibridizarea *in situ*. Cromozomii cu aceeași origine ca probă sunt adesea marcați puternic și uniform, în timp ce ceilalți cromozomi sunt slab marcați și adesea prezintă goluri. Aceste date arată că secvențele repetitive care alcătuiesc majoritatea ADN-ului fiecărui genom prezintă variante specie-specifice, făcând posibilă discriminarea speciilor între ele. Secvențele specifice dispersate în cromozom și responsabile pentru proprietățile de marcare la mamifere sunt neobișnuite la plante, în sensul că probele provenite din cromozomii plantelor nu marchează tipuri singulare de cromozomi (Doudrick și colab., 1995; Schwarzacher și colab., 1997). Analiza moleculară a relevat o altă diferență majoră între plante și animale: în timp ce fiecare cromozom al unei specii de mamifere prezintă un raport GC:AT caracteristic, toți cromozomii fiecărei specii de plante analizate până în prezent (grâu, roșii, fasole) prezintă compoziții nucleotidice similare (Schwarzacher și colab., 1997), cu excepția cromozomilor care prezintă secvențe ADNr, bogate în GC. Luate împreună, toate aceste date indică faptul că ADN-ul repetitiv se comportă diferit la plante și la animale, plantele având un grad mai mare de omogenizare cromozomală (Schwarzacher și colab., 1997), atât pentru repetițiile dispersate, precum retroelementele, cât și pentru secvențele repetate în tandem.

Cunoașterea organizării genomice la plante are și implicații practice legate de creșterea calității mediului și a producției de energie, de identificare de compuși medicinali noi și implicit de creșterea capacității de răspuns la cerințele în continuă creștere ale populației, precum și la schimbările drastice de mediu.

5. EVOLUȚIA CARIOTIPULUI PLANTELOR SUPERIOARE

Genomul celulei vegetale a urmat o evoluție complexă după achiziționarea componentei fotosintetice, acum circa 1,5 miliarde de ani, prin modificări ale structurii și dimensiunii sale.

La plante, dimensiunea cromozomilor, incluzând conținutul de ADN al nucleului, variază uneori în limite de până la 20 de ori între speciile unui gen sau între genomurile aceleiași familii, având același număr de bază de cromozomi sau numere de bază apropiate.

Cromozomii plantelor vasculare au dimensiuni mai mari față de formele inferioare lor, ceea ce denotă faptul că sensul evolutiv prevalent în evoluția lumii vegetale a fost creșterea progresivă a cantității de ADN nuclear, dar acesta este numai un sens evolutiv general, deoarece există și unele excepții. Astfel, genuri evoluate, precum cele care aparțin familiilor înalt specializate ca genul *Arabidopsis*, dintre *Crucifere*, *Panicum*, dintre *Gramineae* și toate genurile familiei *Gesneriaceae*, au cromozomi mai mici și conținut mai mic de ADN nuclear decât reprezentanții unor vasculare primitive, precum *Psilotum*, *Tmesipteris*, *Lycopodium* și *Botrychium*. Numărul de cromozomi la plantele vasculare variază, de la 4 și 6 la genurile *Haploppapus* și *Crepis*, la peste 1200 de cromozomi la feriga *Osmunda*. La *Lycopodium selago (Huperzia selago)* dintre *Lycopodiales*, *2n*= cca. *90, 264, 2+2*, ceea ce denotă intervenția poliploidiei și aneuploidiei în evoluția genomului acestui grup de organisme.

Unele specii de plante, cum ar fi cele care aparțin familiilor *Juncaceae* și *Cyperaceae*, au cromozomi cu centromeri difuzi. La plante sunt rari cromozomii telocentrici. Apariția lor la angiosperme s-a realizat prin rearanjamente cromozomale. Plantele prezintă variații în dimensiunea relativă a cromozomilor. Astfel, în cazul genurilor *Yucca* și *Agave* din familia *Agavaceae* se întâlnesc cromozomi cu dimensiuni contrastante, mari și mici, pe când în alte cazuri, cum este cel al lui *Delphinium*, apare un gradient de lungime a cromozomilor.

Speciile care au cariotipuri omogene simetrice sunt mai puțin specializate comparativ cu cele care au cariotipuri puternic heterogene asimetrice și care prezintă numeroase caracteristici morfologice specializate. Evoluția cariotipului a urmat direcții diferite în diferitele grupe de plante. Astfel, în cazul genului *Crepis*, cel mai primitiv număr de bază a fost probabil *x=6*, în cadrul acestui gen seria evolutivă a acestui *x* fiind descrescătoare, cu excepția creșterii de la *x=6* la *x=7*, care a avut loc în cadrul unei secțiuni mici de specii alpine și subalpine. Dimpotrivă, în cadrul genului *Clarkia*, seria a avut un mers ascendent în cursul evoluției de la *x=7*, la *x=8* și *x=9*, deși la una dintre speciile genului s-a înregistrat și un mers descendent, spre *x=5* (Stebbins, 1971).

Cele mai comune variații în numărul de cromozomi la plantele vasculare sunt eupoliploidiile. La *Agropyrum (x=7)* există specii cu 14, 28, 42, 56 și 70 cromozomi în garnitura somatică. La *Chrysanthemum (x=9)* există specii cu 18, 36, 54, 72 și 90 cromozomi. Dublarea numărului de cromozomi ca urmare a hibridării a dus la geneza multor specii, ca în cazul celor ce aparțin genului *Brassica*, unde există specii cu *x=7*, cu *x=8*, cu *x=9*, *x=10* și cu *x=11*: *B. nigra (2n=2x=16)*; *B. oleracea (2n=2x=18)* și *B. campestris (2n=2x=20)*, sunt forme diploide care au dat naștere prin hibridare, urmată de dublarea numărului de cromozomi, la speciile aloautotetraploide *B. carinata (2n=4x=34)*, *B. napus (2n=4x=38)* și *B. juncea (2n=4x=36)*.

În cadrul genului *Stipa*, numărul de bază este *x=11*, pe când numărul gametic de cromozomi, la diferite specii este de 11, 12, 14, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23, 24, 30, 32, 35 și 36.

Angiospermele lemnoase au în cea mai mare parte cromozomi mici, iar numărul acestora variază. Astfel, *2n=16* la *Ribes uvacrispa* (agriș), *2n=22* la *Corylus avellana* (alun), *2n=28* la *Corylus colurna* (alun turcesc), *2n=28* la *Alnus glutinosa* (arin negru), *2n=64* la *Carpinus betulus* etc.

La angiospermele erbacee anuale sau perene apar mari diferențe în dimensiunea cromozomilor între diferitele genuri ale aceleiași familii. La

Oxalis apar diferențe mari chiar între speciile sale. Astfel, *Oxalis cuneata (2n=2x=12)* are o lungime medie a cromozomilor de 1,5 µm, pe când *O. dispar (2n=2x=12)* are o lungime medie a cromozomilor de 15,1 µm. În familia *Ranunculaceae, Isopyrum fumarioides (n=7)* are 1,3 µm, pe când *Anemone hepatica (n=7)* are 7,0 µm. În familia *Leguminosae, Lotus tenuis (n=6)* are 1,8 µm, pe când *Vicia faba (n=6)* are 14,8 µm. Între *Droseraceae, Drosera rotundifolia (n=10)* are 0,8 µm, pe când *Drosophyllum lusitanicum (n=6)* are 14,0 µm. În familia *Compositae*, tribul *Cichorinae, Agroseris heterophylla (n=9)* are 2,4 µm, pe când *Chaetadelpha wheeleri (n=9)* are 6,4 µm. În familia *Liliaceae, Tofieldia nuda (n=15)* are 1,3 µm, pe când *Lilium pardalinum (n=12)* are 20,0 µm. În familia *Gramineae, Chloris barbata (n=10)* are 1,5 µm, iar *Secale cereale (n=7)* are 7,2 µm.

Aceste diferențe în lungimea cromozomilor și în conținutul de ADN nuclear sunt explicate prin admiterea că un conținut mai mare de ADN nuclear indică prezența unui anumit număr mai mare de gene active și de aici o mai mare diversitate în funcția genică. Organismele care au cantități mari de ADN nuclear conțin o mare proporție de ADN cu secvențe nonsens de nucleotide sau conțin cromozomi multinemici, deci care au multe molecule identice de ADN, deși ei apar în număr diploid.

Diferența între ADN înalt repetitiv de *Triticum monococcum* și speciile de *Aegilops squarrosa* și *Ae. speltoides* este de numai 0,5%, iar acest fapt le-a permis acestor specii să se hibridizeze și să genereze grâul hexaploid (*Triticum aestivum*).

Genul *Trillium* conține specii diploide cu același număr de cinci perechi de cromozomi foarte mari (fig. 12), și atât dimensiunea cromozomilor cât și morfologia generală a lor sunt remarcabil de constante, în cadrul acestui gen. Populațiile de *Trillium kamtschaticum* din Japonia, asemănător celor de *T. ovatum* din vestul Americii de Nord, prezintă polimorfism pentru alociclie, adică persistență de segmente cromozomale necondensate în stadii precum profaza târzie și metafaza, când întregul cromozom este în mod normal condensat. Acest polimorfism al alocicliei este consecința interacțiunilor complexe dintre mutație, recombinare genetică prin crossing-over, selecție naturală și drift genetic.

Cromozomii speciei *Hepatica acutiloba* (fig. 13) dintre Angiosperme sunt mari, cei mai mulți metacentrici, și doar o singură pereche de acrocentrici

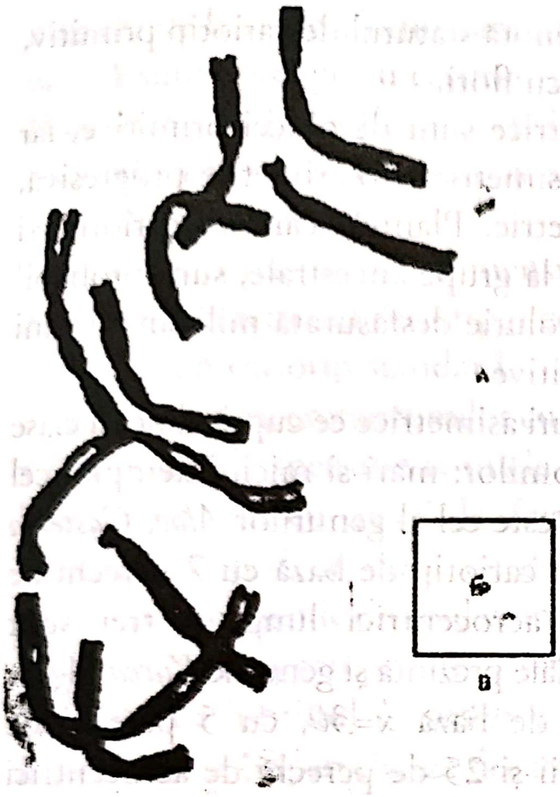


Fig. 12 — Cei 10 cromozomi somatici la *Trillium erectum* (A) și la *Arabidopsis thaliana* (B), la același ordin de magnitudine. Volumul nuclear al primei specii este de aproximativ 50 de ori mai mare decât la a doua specie (*Trillium* din Sparrow și Evans, 1961, iar *Arabidopsis* din Sears, 1961).

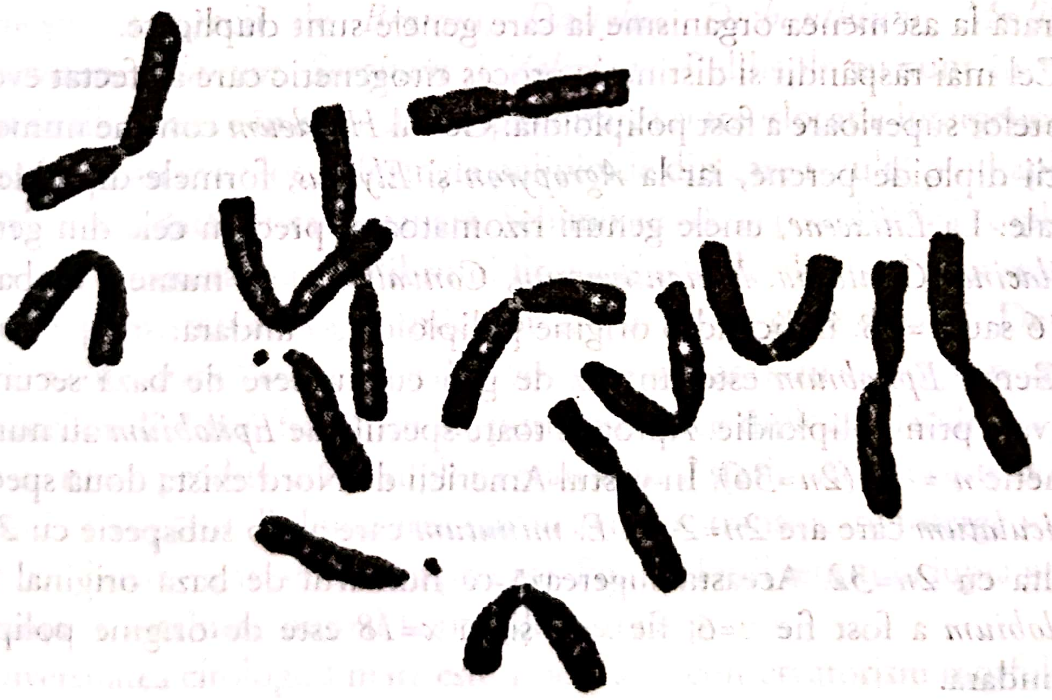


Fig. 13 — Cei 14 cromozomi de la *Hepatica acutiloba* (după Marchant și Adamovich, 1988).

au sateliți. Morfologia cromozomilor denotă statutul de cariotip primitiv, nediferențiat, al acestui grup de plante cu flori.

În regnul vegetal, cariotipurile simetrice sunt de obicei primitive, iar sensul dominant de evoluție este de la simetric la o asimetrie progresivă, cu unele excepții de reversie spre simetrie. Plantele care au cariotipuri deosebit de asimetrice, dar care aparțin la grupe ancestrale, sunt probabil mai curând arhaice și braditelice (cu evoluție desfășurată milioane de ani fără modificări) decât cu adevărat primitive.

Cariotipurile bimodale sunt cariotipuri asimetrice ce cuprind două clase clar distincte de dimensiune a cromozomilor: mari și mici. Exemplul cel mai bine cunoscut de cariotip bimodal este cel al genurilor *Aloe, Gasteria* și *Haworthia* dintre *Liliales*, care au un cariotip de bază cu 7 perechi de cromozomi, dintre care patru sunt acrocentrici lungi și trei sunt acrocentrici scurți. Tot cariotipuri bimodale prezintă și genurile *Yucca, Agave* și *Furcraea*, care au un complement de bază $x=30$, cu 5 perechi de cromozomi acrocentrici lungi sau medii și 25 de perechi de acrocentrici foarte mici.

Cariotipurile bimodale derivă din cariotipurile simetrice, de origine poliploidă, rezultând prin pierdere diferențiată de segmente cromozomale, tolerată la asemenea organisme la care genele sunt duplicate.

Cel mai răspândit și distinctiv proces citogenetic care a afectat evoluția plantelor superioare a fost poliploidia. Genul *Hordeum* conține numeroase specii diploide perene, iar la *Agropyron* și *Elymus*, formele diploide sunt anuale. La *Liliaceae*, unele genuri rizomatoase, precum cele din genurile *Smilacina, Clintonia, Maianthemum, Convallaria*, au numere de bază de $n=16$ sau $n=18$, indicând o origine poliploidă secundară.

Genul *Epilobium* este un caz de gen cu numere de bază secundare, derivate prin poliploidie. Aproape toate speciile de *Epilobium* au numărul gametic $n = 18$ $(2n=36)$. În vestul Americii de Nord există două specii: *E. peniculatum* care are $2n=24$ și *E. minutum* care are o subspecie cu $2n=26$ și alta cu $2n=32$. Aceasta sugerează că numărul de bază original al lui *Epilobium* a fost fie $x=6$, fie $x=9$ și că $x=18$ este de origine poliploidă secundară.

Numerele de bază ale genurilor lemnoase moderne au derivat prin poliploidie ancestrală; numerele originale de bază la angiosperme, atât la cele lemnoase, cât și la cele ierboase, au fost $x=6$ și $x=7$. Familiile care au numere de bază de cromozomi mai mari decât valoarea modală *x=12*, 13 sau 14 sunt aproape cu certitudine de origine poliploidă: *Rosaceae*, tribul *Pomoideae* x=*17*; *Oleaceae*, tribul *Oleoideae* *x=23*, *Salicaceae* *x=19*, *Magnoliaceae* *x=19*, *Platanaceae* *x=21*, apoi genurile *Tilia* *x=41*, *Aesculus* *x=20*, *Erythrina* *x=21*.

Există o corelație între dimensiune și cariotip, plantele cu tulpinile cele mai lungi prezentând cariotipul cel mai avansat, pe când plantele cele mai scurte au un cariotip standard.

Fragmentarea cromozomilor cu centromeri difuzi, numită agmatoploidie, a fost o cale de speciație la unele specii. Prin iradiere s-au putut produce linii fertile noi, cu *2n=8*, la *Luzula purpurea*, pornind de la cariotipul standard *2n=6*. *L. sudetica*, cu *2n=48*, este un agmatoploid (endoploidie) cu un conținut genic diploid comparabil cu diploidul adevărat *L. pallescens* *2n=12* și două specii presupus tetraploide: *L. groenlandica* și *L. multiflora* *(2n=24)*. La hibridul *L. sudetica x L. pallescens*, șase cromozomi mari de *L. pallescens* se împerechează fiecare cu patru cromozomi mici de *L. sudetica*. Datele privind conținutul de ADN sunt în acord cu existența fenomenului de agmatoploidie, în cadrul acestui gen.

Polihaploidia la plante a putut juca un anumit rol în evoluție. Ea se întâlnește la specii de *Bromus*, *Dactylus*, *Dichanthium*, *Medicago*, *Parthenium*, *Solanum*, *Sorghum* și *Valeriana*. Polihaploizii sunt în unele cazuri fertili, ceea ce înseamnă că diploidizarea și translocația intergenomică la aceștia nu au avut loc la formele poliploide din care rezultă polihaploizi, reflectând totodată vârsta lor tânără. Schimbarea de la poliploidie la diploidie este o cale de ajustare a echilibrului fitnessului și flexibilității prin selecție.

Polihaploizii nu adaugă nimic nou la fondul de gene diploid. De Wet (1971) a constatat că tetraploizii de *Dichanthium* care s-au extins peste arealul ancestorilor diploizi, fie că nu au putut produce diploizi viabili sau dacă acest lucru s-a produs, acești diploizi erau slabi și sterili. Aceasta este dovada faptului că a apărut diploidizarea sau au avut loc translocații intergenomice sau o combinație a acestor două procese. Polihaploizii reușiți în lupta pentru existență se întâlnesc numai la poliploizii relativ noi.

Diversitatea citologică mare este asociată cu conservatorism morfologic, pe când specializarea morfologică se asociază cu omogenitatea citologică sau cu alterări de cromozomi individuali. Această evoluție necesară poate fi explicată numai admițând că specializarea morfologică, precum și evoluția unor căi noi de a se adapta la mediu se bazează pe schimbări de nivel genetic. Multiplicarea seturilor de cromozomi are fie efect redus asupra progresului evolutiv la nivel genic, fie că tinde să îl întârzie (Gavrilă, 1989).

CAPITOLUL XXXIV

ORGANIZAREA STRUCTURAL-FUNCȚIONALĂ A GENOMULUI LA *Drosophila melanogaster*

1. INTRODUCERE

Drosophila melanogaster (numită inițial *Drosophila ampelophila*) sau musculița de fructe, este o insectă care face parte din ordinul *Diptera*. Acest organism a fost adoptat ca model experimental în genetică, de către savantul american Thomas Hunt Morgan. După aproape un secol de studii extensive, musculița de fructe a fost caracterizată foarte bine din punct de vedere genetic și al biologiei moleculare, ceea ce permite utilizarea acestui organism ca model experimental eucariot în arii de cercetare precum genetica dezvoltării, diferențierea celulară, reglajul ciclului celular, comunicarea intercelulară, precum și în studii de biomedicină, neurobiologie și etologie.

D. melanogaster se crește ușor, pe medii ieftine, are o prolificitate ridicată și un ciclu de viață de doar 10 zile la temperatura de 25°C. În plus, numărul foarte mare de mutații identificate și caracterizate, existenta hărților citologice și genetice de mare rezoluție, utilizarea cromozomilor artificiali numiți **balanceri**, precum și dezvoltarea unor tehnici speciale de inginerie genetică aplicabile acestui organism, permit desfășurarea de experimente de analiză genetică deosebit de rafinate, care nu pot fi realizate cu nici un alt organism eucariot complex.

1.1 IMPORTANȚA ORGANISMULUI MODEL *D. melanogaster* ÎN DEZVOLTAREA GENETICII

Experimentele de genetică clasică efectuate de către T.H. Morgan și colaboratorii acestuia cu *D. melanogaster*, au permis elaborarea teoriei cromozomale a eredității.

Dovada incontestabilă că genele sunt plasate în cromozomi, a fost furnizată de studiul genei *white* de la *D. melanogaster*, prin care s-a demonstrat că această genă, care determină culoarea ochilor, este plasată în cromozomul X. Studiind o mutație care determină apariția ochilor de culoare albă la musculița de fructe, T.H. Morgan a observat o abatere de la rezultatele experimentelor lui Mendel, în care încrucișările (*cross*-urile) reciproce dădeau rezultate identice. Morgan a realizat un experiment de monohibridare, pornind de la un singur mascul cu ochii albi, obținut prin mutație spontană (la *D. melanogaster*, tipul sălbatic are ochii roșii-cărămizii). Acest mascul a fost încrucișat cu femele de tip sălbatic, iar în generația F1 toți indivizii aveau ochi de culoare normală, ceea ce demonstra că alela pentru fenotipul de tip sălbatic al ochilor este dominantă, iar alela care determină apariția ochilor de culoare albă este recesivă. Prin încrucișări de tip frate-soră ale indivizilor din generația F1, Morgan a obținut generația F2, care era formată din 2459 de femele cu ochii roșii-cărămizii, 1011 masculi cu ochi de aceeași culoare și 782 de masculi cu ochii albi. Aceste rezultate reflectau o conexiune clară între fenotipul ochi albi și sexul indivizilor cu acest fenotip, care erau în exclusivitate masculi.

Într-un experiment de *back-cross*, Morgan a încrucișat femele cu ochi de culoare normală (provenite dintr-un *cross* între femele de tip sălbatic cu masculi cu ochi de culoare albă) cu masculi parentali cu ochi albi. Descendenții acestui *back-cross* erau împărțiți în două categorii fenotipice, indiferent de sex și în proporții relativ egale, reprezentate de indivizi cu ochi albi și indivizi cu ochi roșii-cărămizii. În sfârșit, o altă informație valoroasă în sprijinul teoriei cromozomale a eredității a fost oferită de interpretarea rezultatelor încrucișării între femele cu ochii albi și masculi de tip sălbatic. Toți masculii rezultați din această încrucișare aveau ochii albi, în timp ce toate femelele aveau ochii roșii-cărămizii. Această încrucișare este reciprocă primei încrucișări efectuate de Morgan, în urma căreia rezultau numai indivizi cu ochi normali, ceea ce demonstrează că în cazul *cross*-urilor reciproce se obțin rezultate diferite.

În urma acestor experimente, Morgan a concluzionat că încrucișările reciproce nu ar fi putut furniza rezultate diferite decât în cazul în care alela care determină apariția ochilor albi ar fi fost plasată în cromozomul X, deoarece datele citologice indicau că acest cromozom se transmite, în cazul masculilor, după un model diferit comparativ cu cel de la femele. Masculii

(XY) transmit cromozomul X doar la fiicele lor, în timp ce femelele (XX) transmit câte un cromozom descendenților de ambele sexe. Ipoteza că gena *white* ar fi plasată pe cromozomul X (genă X-*linkată*), implică faptul că masculii nu au decât o singură genă *white*, în timp ce femelele pot avea două alele, identice sau diferite, ale acestei gene.

În concluzie, se remarcă următoarele trăsături caracteristice transmiterii/moștenirii unei gene X-*linkate*:

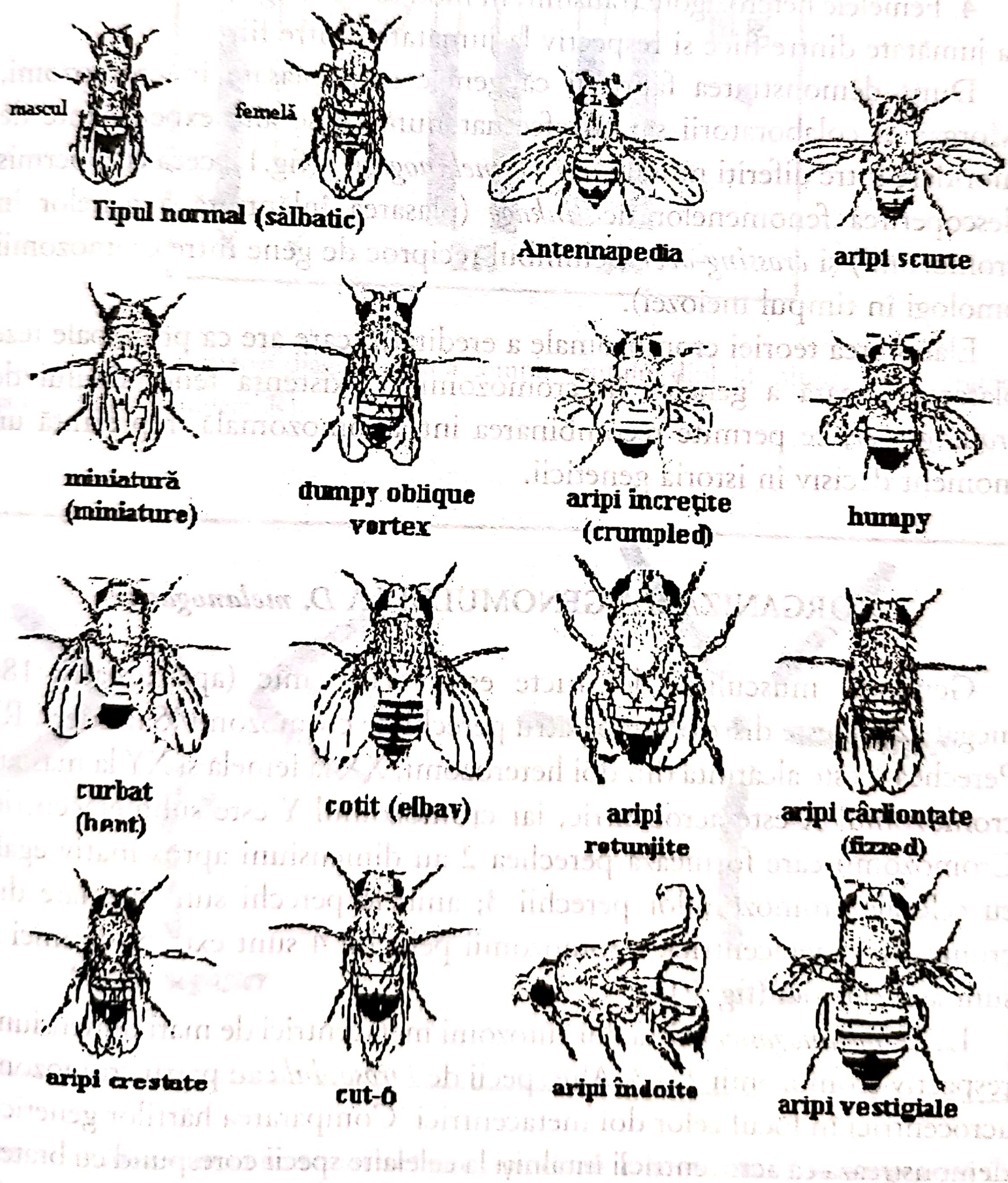

mascul
femelă
Tipul normal (sălbatic)
Antennapedia
aripi scurte
miniatură (miniature)
dumpy oblique vertex
aripi încrețite (crumpled)
humpy
curbat (bent)
cotit (elbav)
aripi rotunjite
aripi cârlionțate (fizzed)
aripi crestate
cut-6
aripi îndoite
aripi vestigiale

Fig.1 — Diferite fenotipuri mutante la *D. melanogaster*

1. Încrucișările reciproce (mascul mutant x femelă de tip sălbatic, și respectiv mascul de tip sălbatic x femelă mutantă), dau rezultate diferite în generația F1.

2. Masculii care moștenesc o alelă mutantă X-linkată o manifestă fenotipic, deoarece pe cromozomul Y nu există alela normală pentru gena respectivă.

3. Masculii mutanți transmit alela mutantă la toate fiicele lor.

4. Femelele heterozigote transmit, în mod teoretic egal, o alelă X-linkată la jumătate dintre fiice și respectiv la jumătate dintre fii.

După demonstrarea faptului că genele sunt plasate în cromozomi, Morgan și colaboratorii săi au efectuat numeroase alte experimente de hibridare între diferiți mutanți de *D. melanogaster* (fig.1), ceea ce a permis descoperirea fenomenelor de *linkage* (plasarea înlănțuită a genelor în cromozomi) și *crossing-over* (schimbul reciproc de gene între cromozomii omologi în timpul meiozei).

Elaborarea teoriei cromozomale a eredității, care are ca principale teze plasarea lineară a genelor în cromozomi și existența fenomenului de *crossing-over*, ce permite recombinarea intracromozomală, reprezintă un moment decisiv în istoria geneticii.

2. ORGANIZAREA GENOMULUI LA *D. melanogaster*

Genomul musculiței de fructe este relativ mic (aproximativ 180 megabaze) și este distribuit pe patru perechi de cromozomi (Saunders, R). Perechea 1 este alcătuită din doi heterozomi, XX la femelă și XY la mascul; cromozomul X este acrocentric, iar cromozomul Y este submetacentric. Cromozomii care formează perechea 2 au dimensiuni aproximativ egale cu cele ale cromozomilor perechii 3; ambele perechi sunt formate din cromozomi metacentrici. Cromozomii perechii 4 sunt extrem de mici și sunt acrocentrici (fig. 2).

La *D. melanogaster* există doi autozomi metacentrici de mari dimensiuni, respectiv cromozomii 2 și 3. Alte specii de *Drosophila* au patru cromozomi acrocentrici în locul celor doi metacentrici. Compararea hărților genetice, demonstrează că acrocentricii întâlniți la celelalte specii corespund cu brațele metacentricilor 2 și 3 de la *D. melanogaster*, ceea ce demonstrează că, în

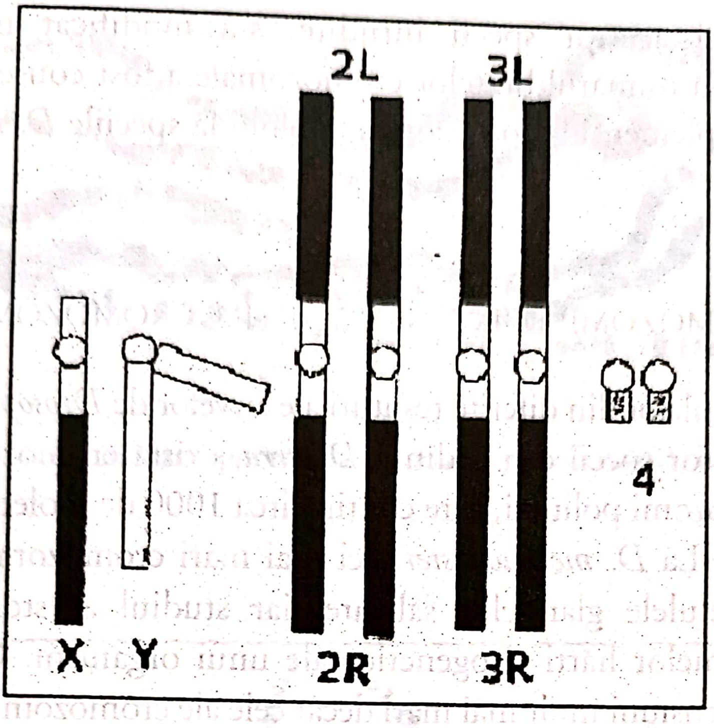

2L
3L
X
Y
2R
3R
4

Fig. 2 — Reprezentarea diagramatică a complementului diploid mitotic la *D. melanogaster* (După Saunders, R).

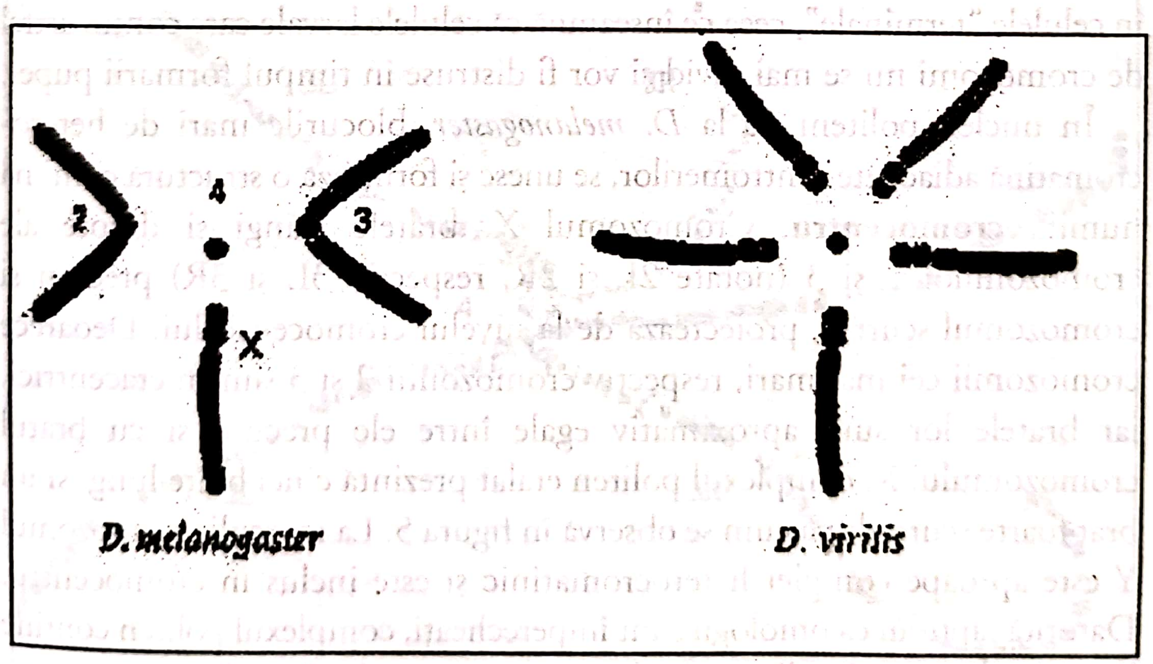

2
4
3
X
D. melanogaster
D. virilis

Fig. 3 — Conservarea numărului de brațe cromozomale la speciile *D. melanogaster* și *D. virilis* (După Hartl, D. 1998).

cursul evoluției acestor specii înrudite, s-a modificat numărul de cromozomi, însă numărul brațelor cromozomale a fost conservat. Figura 3 prezintă complementul cromozomal haploid la speciile *D. melanogaster* și *D. virilis*.

2.1 CROMOZOMII POLITENI ȘI HĂRȚILE CROMOZOMALE

În nucleii celulelor din diferite țesuturi ale larvelor de *Drosophila*, precum și ale multor altor specii din ordinul *Diptera*, există cromozomi giganți, numiți și cromozomi politeni, care conțin circa 1000 de molecule de ADN aliniate paralel. La *D. melanogaster*, cei mai mari cromozomi politeni se întâlnesc în celulele glandelor salivare, iar studiul acestora a permis întocmirea primelor hărți citogenetice ale unui organism. Cromozomii politeni au dimensiuni mult mai mari decât cele ale cromozomilor obișnuiți și prezintă un model caracteristic de benzi și interbenzi (fig.4).

Structurile politene se formează prin replicarea repetată a moleculelor de ADN din fiecare pereche de cromozomi omologi sinapsați, fără separarea fibrelor de cromatină rezultate în urma replicării. Cromozomii politeni apar în celulele "terminale", ceea ce înseamnă că celulele larvale care conțin astfel de cromozomi nu se mai divid și vor fi distruse în timpul formării pupei.

În nucleii politeni de la *D. melanogaster*, blocurile mari de heterocromatină adiacente centromerilor, se unesc și formează o structură comună numită **cromocentru**. Cromozomul X, brațele stângi și drepte ale cromozomilor 2 și 3 (notate 2L și 2R, respectiv 3L și 3R) precum și cromozomul scurt 4, proiectează de la nivelul cromocentrului. Deoarece cromozomii cei mai mari, respectiv cromozomii 2 și 3 sunt metacentrici, iar brațele lor sunt aproximativ egale între ele precum și cu brațul cromozomului X, complexul politen etalat prezintă cinci brațe lungi și un braț foarte scurt, după cum se observă în figura 5. La masculi, cromozomul Y este aproape complet heterocromatinic și este inclus în cromocentru. Datorită faptului că omologii sunt împerecheați, complexul politen conține doar 4 cromozomi politeni și 6 brațe cromozomale. Brațul corespunzător cromozomului 4 are o lungime ce reprezintă circa 5% din cea a brațelor mari (fig. 4, 5).

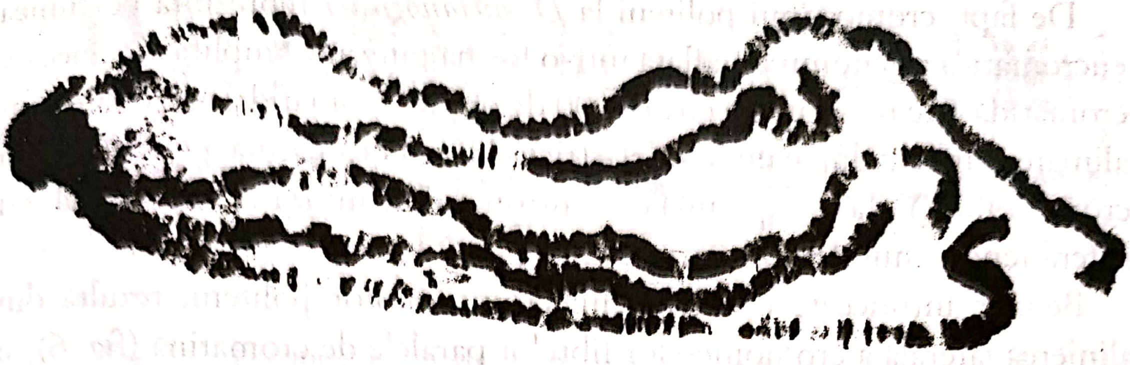


Fig. 4 — Cromozomi politeni la *D. melanogaster* (Gavrilă, I.. original)

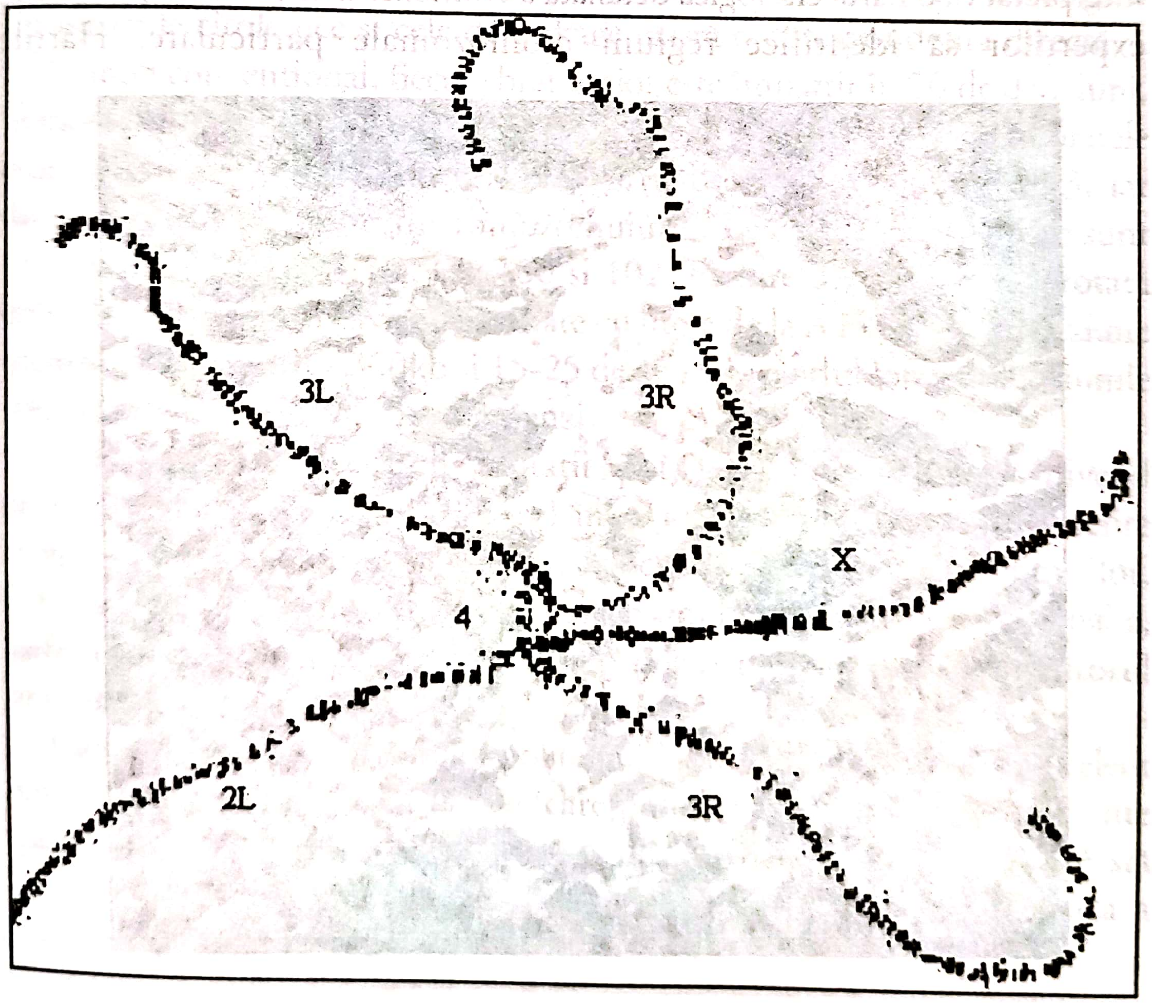


Fig. 5 — Complexul cromozomilor politeni la *D. melanogaster* (După Lefevre, G.)

De fapt, cromozomii politeni la *D. melanogaster* reprezintă porțiunea eucromatică a genomului, aflată într-o formă puternic amplificată. Fiecare cromatidă este replicată de circa 1000 de ori, iar cromatidele rezultate sunt aliniate paralel, după un model strict. Heterocromatina pericentrică și cromozomul Y, care împreună cu centromerii formează cromocentrul, nu suferă fenomenul de politenizare.

Benzile întunecate de la nivelul cromozomilor politeni, rezultă din alinierea laterală a cromomerelor fibrelor paralele de cromatină (fig. 6), și conțin mai mult ADN decât benzile luminoase, numite și interbenzi.

Modelul de distribuție al acestor benzi și interbenzi este caracteristic pentru fiecare specie de *Drosophila*, la *D. melanogaster* fiind identificate circa 5000 de benzi. Acest model specific și constant de bandare poate fi interpretat ca o hartă citologică detaliată a cromozomilor politeni, permițând experților să identifice regiuni cromozomale particulare. Hărțile

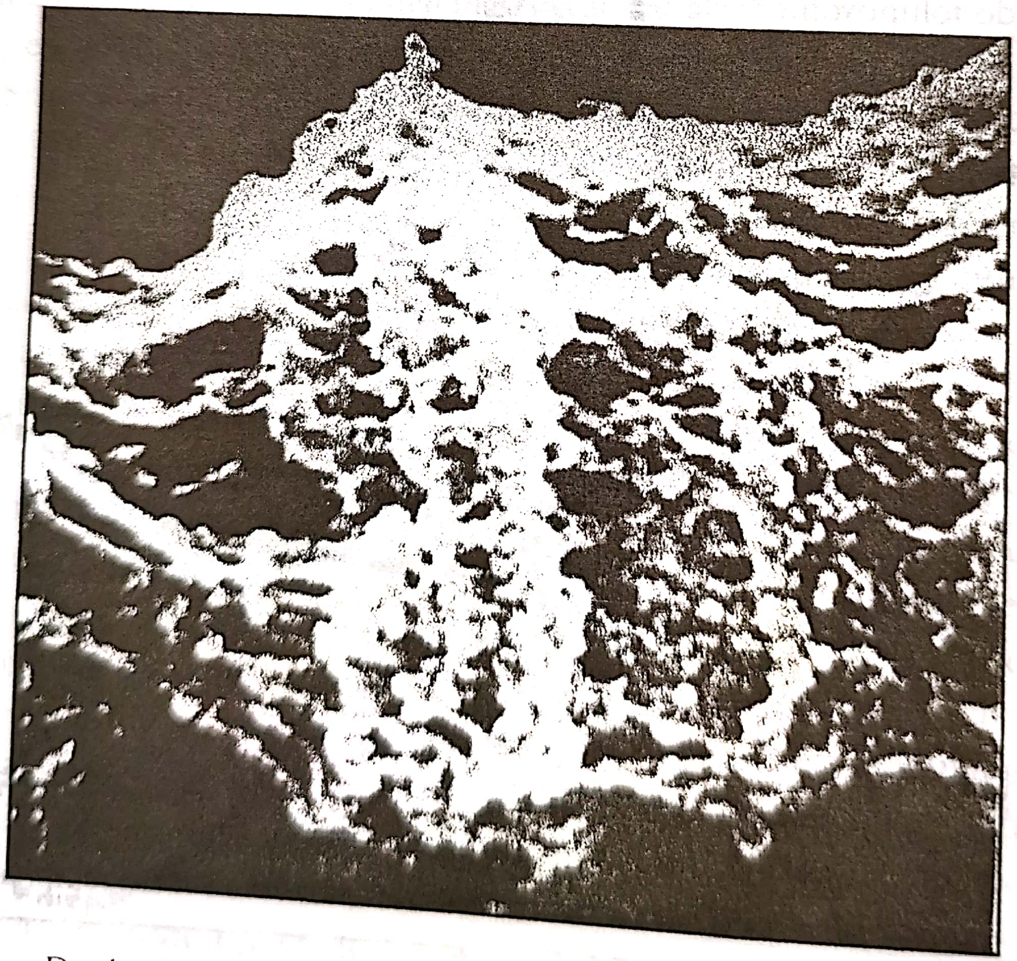


Fig. 6 — Detaliu de microscopie electronică a unui fragment dintr-un cromozom politen la *D. melanogaster*. Se observă fibrele paralele de cromatină. (După Sorsa)

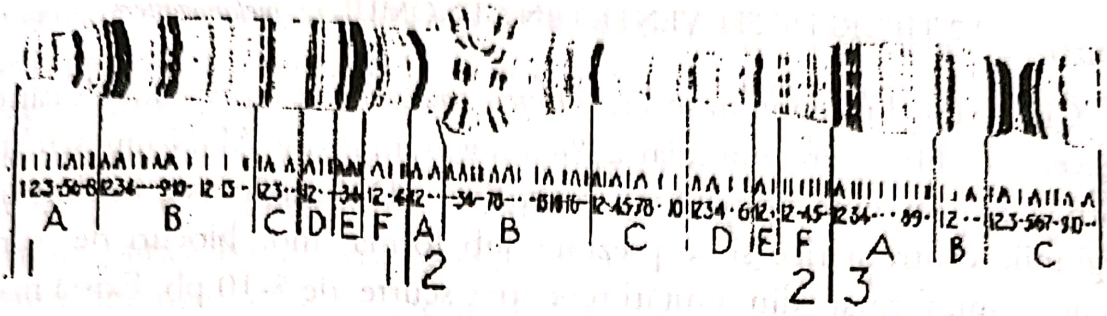


Fig. 7 — Fragment din harta cromozomală a cromozomului politen X (după Bridges, 1935).

cromozomale utilizate astăzi (fig. 7), sunt derivate din cele realizate în anii '30 de către Calvin Bridges, care împreună cu Alfred Sturtevant și H.J. Muller au fost cei mai străluciți discipoli și colaboratori ai lui T.H. Morgan. Între hărțile citologice și cele de linkage există o corespondență directă.

În mod convențional, fiecare braț major este împărțit în 20 de diviziuni, numerotate de la 1 la 20 pentru cromozomul X, de la 21 la 60 pentru brațele cromozomului 2, de la 61 la 100 pentru brațele cromozomului 3, iar diviziunile 101 și 102 revin cromozomului Y. Diviziunile telomerice sunt cele numerotate 1, 21, 60, 61, 100 și 102. Fiecare diviziune numerotată este împărțită în 6 subdiviziuni, notate cu litere de la A la F. O subdiviziune conține în medie circa 300kb și 15-25 de gene; la rândul lor, subdiviziunile sunt împărțite în maximum 13 benzi.

Genele identificate prin mutații pot fi cartate precis la nivelul cromozomilor politeni, cu ajutorul unui număr mare de rearanjamente cromozomale cunoscute, de tipul translocațiilor, inversiilor, duplicațiilor, deficiențelor (delețiilor) și translocațiilor. Rezoluția cartării este foarte înaltă, astfel încât regiuni mai mici de 100kb pot fi ușor localizate cu ajutorul microscopului optic.

Caracteristicile cromozomilor politeni, fac din aceștia un material excelent pentru tehnica hibridizării *in situ*, care permite localizarea unor secvențe specifice de ADN cu o rezoluție de o singură bandă, astfel încât această tehnică este deosebit de valoroasă pentru proiectele de cartare fizică a genomului.

2.2 TIPURI DE SECVENȚE DIN GENOMUL *D. melanogaster*

Circa 61% din genomul speciei *D.melanogaster* este reprezentat de către secvențe codificatoare unice, iar 21% din genom revine ADN-ului satelit, format din secvențe simple înalt repetitive. ADN satelit este întâlnit în regiunile centromerice și se prezintă sub forma unor blocuri de mari dimensiuni, formate din unități repetitive scurte, de 5-10 pb. Există mai multe clase de ADN satelit, în funcție de natura secvenței repetitive, clase care prezintă specificitate de distribuție pe diferitele tipuri de cromozomi și care sunt prezente mai ales la nivelul heterocromatinei. Un exemplu este *satelitul 359 pb*, care este format din repetiții ale unei secvențe de 359 pb, fiind întâlnit doar în cromozomul X. Secvențele moderat repetitive reprezintă circa 18% din genomul *D. melanogaster* (Saunders).

Fenomenul de amplificare genică este întâlnit și la *D. melanogaster*. Astfel, la femele, genele care produc proteinele corionului sunt amplificate în celulele foliculare chiar înainte de maturarea ovocitului, permițând producerea unor cantități mari de proteină într-un interval mic de timp. Ca o curiozitate, la *D.melanogaster* pseudogenele sunt foarte rare.

Circa 120 Mb din genom sunt reprezentate de către eucromatină, care este distribuită pe cromozomul X și pe autozomii perechilor 2 și 3. Se estimează că la nivelul cromozomului 4 există doar circa 1 Mb de eucromatină. La *D. melanogaster* au fost identificate și secvențe unice încadrate de heterocromatină, cum este cazul genei *rolled* din cromozomul 2, care este flancată la fiecare capăt de regiuni heterocromatice de cel puțin 3 Mb. Porțiunea heterocromatică a genomului haploid de *D. melanogaster* este estimată la aproxiamativ 60 de Mb și conține doar circa 25 de loci esențiali cunoscuți, fiind formată în principal din secvențe de ADN satelit, gene ribozomale și elemente transpozabile.

2.3 ASPECTE ALE FENOMENULUI DE PLEIOTROPIE LA *D. MELANOGASTER*

Numărul locilor letali la *D. melanogaster* era estimat inițial la circa 5000 (Nusslein-Volhardt, 1994; Lewin, 1994), însă datele experimentale recente, furnizate de mutageneza de saturație a unor regiuni cromozomale, sugerează că un număr de circa 3600 de loci letali reprezintă o variantă mai apropiată de realitate (Miklos et al, 1996). La organismele multicelulare, este dificil de realizat o estimare realistă și completă a consecințelor fenotipice ale mutagenezei naturale sau artificiale. Astfel, la *D. melanogaster*, o mutație nouă care se produce la un alt situs, adesea supresează parțial fenotipul mutant inițial. Numeroase gene de la *D. melanogaster* au efect pleiotrop, controlând mai multe aspecte ale fenotipului. De fapt, la *D. melanogaster*, pleiotropia este mai degrabă o regulă decât o excepție (Greenspan et al., 1996), ceea ce se traduce prin faptul că ARN-ul mesager, sau proteina codificată de către o genă cu efect pleiotrop, sunt implicate funcțional în diferite procese moleculare, care se desfășoară în contexte spațio-temporale diferite. De exemplu, proteina transmembranară Notch de la *D. melanogaster*, este implicată în interacții intercelulare variate, care se desfășoară în țesuturi diferite. O analiză funcțională la scară mare a fost realizată la nivelul liniei germinale, iar rezultatele au arătat că circa 75% din cei aprox. 3.600 de loci letali de la *D. melanogaster*, sunt necesari în stare activă în timpul ovogenezei, întrucât absența produșilor acestor loci conduce fie la o ovogeneză anormală, fie la moartea unor celule ale liniei germinale. Analiza procesului de formare a ochiului indică un rezultat similar, circa 70% dintre cei 3600 de loci letali sunt aparent implicați în procesul de dezvoltare a ochiului la musculița de fructe. Aceste date relevă gradul înalt de pleiotropie existent la *D. melanogaster*, cel puțin în ceea ce privește locii letali.

Date suplimentare privind estimarea gradului de pleiotropie la acest organism, sunt furnizate de către studiul modelului de expresie spațio-temporală a genelor. Astfel, din studiul a circa 600 de linii *enhancer-trap*, alese la întâmplare, în care gena reporter se exprimă la nivelul creierului larvei de *D. melanogaster*, a rezultat că numai două dintre aceste linii exprimă gena reporter doar la nivelul sistemului nervos. În mod similar, într-un studiu în care au fost folosite circa 20.000 de linii *enhancer-trap*, mai mult de 15% dintre acestea se exprimau în timpul procesului de dezvoltare al retinei, însă doar una dintre aceste linii exprimă gena reporter doar la nivelul retinei. Totuși, aceste date experimentale nu trebuie absolutizate, deoarece exprimarea unei proteine într-un anumit tip celular nu are întotdeauna rațiuni funcționale. Exprimarea în diferite celule a unei proteine poate fi o consecință a deteriorării rețelei reglatoare a genei respective în timpul inserției randomice a derivatului elementului P cu ajutorul căruia au fost construite liniile *enhancer-trap*, sau rezultatul unor fenomene de tipul PEV (variegarea datorată efectului de poziție), care schimbă mediul cromatinic în care sunt localizate genele studiate.

Majoritatea informațiilor referitoare la desfășurarea proceselor de dezvoltare la *D. melanogaster* provin din experimente de mutageneză care au generat mutații *loss-of-function* (pierderea completă a funcționalității) ale genelor implicate în dezvoltare. Datele obținute prin analiza fenotipurilor unor astfel de mutanți au fost esențiale pentru elucidarea modelului după care se desfășoară embriogeneza la *D. melanogaster*. Totuși, abordarea unor probleme de biologie moleculară prin tehnica generării de mutații *loss-of-function*, prezintă unele limite. Astfel, pentru majoritatea genelor, fenotipul *loss-of-function* nu este ușor de detectat și chiar dacă fenotipul mutant este observat, el poate reprezenta doar un fenotip parțial, care reprezintă acea parte din funcția unei gene care nu poate fi compensată de acțiunea altor gene, sau a altor căi biochimice. În plus, fenomenul de pleiotropie complică analiza funcțiilor genei mutante. Dacă o mutație a unei gene are ca efect moartea embrionului, sunt imposibil de detectat efectele pe care le poate avea această mutație asupra fenotipului adultului.

2.4 REZULTATE ALE SECVENȚIERII PORȚIUNII EUCROMATICE A GENOMULUI *D. melanogaster*

Descifrarea secvenței eucromatinei la *D. melanogaster* a furnizat cercetătorilor din domeniu informații științifice extrem de utile, atât pentru cercetarea fundamentală cât și pentru potențiale aplicații în genetica medicală (Adams et al., 2000).

Astfel, în acord cu predicțiile furnizate de experimentele de mutageneză, numărul genelor (estimat prin prelucrarea informatică a secvenței eucromatinei) este de 13.601, ceea ce înseamnă că pentru fiecare dintre cele circa 5000 de benzi din cromozomii politeni corespund câte 2-3 gene. Dintre aceste gene, mai mult de 5.500 sunt duplicate, ceea ce explică parțial frecvența ridicată a benzilor dublet din cromozomi politeni, adică a benzilor adiacente, aproape identice (Bridges, 1938).

În conformitate cu datele furnizate de secvențierea parțială a genomului, proteinele de la *D. melanogaster* pot fi clasificate în 8.065 familii distincte.

Circa 5.000 dintre aceste familii se regăsesc și la *Caenorhabdites elegans*. La *D. melanogaster*, există circa 300 de protein-kinaze și 80 de protein-fosfataze, 352 de proteine zinc-finger de tipul C2H2, 199 de serin-proteaze asemănătoare tripsinei (nici un alt organism cunoscut nu prezintă un asemenea grad de amplificare al unei familii de proteine) și 153 de proteine ce prezintă similarități cu imunoglobulinele și cu proteinele complexului major de histocompatibilitate. Dintre cei aproximativ 700 de factori de transcripție identificați, 170 erau deja izolați și clasificați, ca rezultat al unor proiecte de cercetare anterioare.

S-a constatat ca 61% (177) dintre cele 289 de gene care sunt implicate în determinarea unor maladii ereditare umane, au corespondenți ortologi (omologi) la *D. melanogaster*. Ca exemple sunt menționate gene care codifică proteine asociate cu anumite forme de cancer sau cu unele boli neurologice, cum ar fi genele *p53* și *parkin*. Aceste descoperiri reprezintă o demonstrație suplimentară a valorii excepționale pe care o are modelul *D. melanogaster* pentru studierea mecanismelor genetice care stau la baza unor maladii umane cu substrat ereditar.

Multă vreme musculița de fructe a fost considerată un organism al cărui genom nu conține 5-metilcitozină. S-a descoperit însă că genomul speciei *D. melanogaster* ar codifica pentru două proteine care prezintă similitudini cu *citozin DNA metiltransferaza* (dDNMT) și respectiv cu proteina *MBD (methyl-*C_p*G-binding protein)*, întâlnită la mamifere. ADN metiltransferaza ipotetică de la *D. melanogaster*, simbolizată dDNMT, este strâns înrudită cu proteinele din familia pmt1/DNMT2, identificate la drojdiile care se divid prin fisiune, precum și la *Mus musculus*. Deși transcriptul *dDNMT* este prezent în embrioni, în larve și în adulți, nu a fost demonstrată funcția de metilază a proteinei respective.

Au fost identificați doi transcripți care codifică proteina dMBD2/3 de la *Drosophila*. Transcripții sunt decelabili în culturi celulare, în embrionii de 0-4 ore, precum și în adulți, ceea ce sugerează o expresie generalizată a acestei gene. Transcriptul mai scurt, rezultat în urma *splicing*-ului, nu conține o parte din regiunea omoloagă a *methyl-CpG-binding-domain*. Secvența carboxi-terminală a proteinei dMBD2/3 este asemănătoare cu cea a proteinelor mamaliene MBD2 și MBD3, ambele aparținând complexului corepresor care conține histon-deacetilaza. Cu toate că la musculița de fructe nu au fost evidențiate activități de metilare codificate de către aceste enzime, descoperirea lor a reprezentat un prim indiciu că procesul de metilare a genomului a existat cel puțin la ancestorii speciei *D. melanogaster* și că cele două proteine reprezintă vestigii ale unui sistem de metilare. Totuși, date științifice foarte recente demonstrează că procesul de metilare este detectabil la nivelul embrionului. Analiza prin HPLC a ADN-ului genomic extras de la embrioni de 0-4 ore, a demonstrat prezența în cantități reduse a 5-metilcitozinei, ceea ce sugerează existența unui mecanism de metilare a genomului la *D. melanogaster*.

Studiul comparativ al secvențelor genomice arată că circa 3.000 de gene sau corespondenți ai acestora se întâlnesc la musculița de fructe, la nematodul *C. elegans* și la drojdia *Saccharomyces cerevisiae*. Se consideră că aceste gene codifică mașinăria biochimică fundamentală a celulei eucariote. Evidențierea conservării funcțiilor genelor este însă mult mai greu de realizat decât demonstrarea conservării lor structurale, care se poate realiza *in silico*, prin secvențierea genomurilor și compararea computerizată a secvențelor genice de interes. Cuantificarea gradului de conservare funcțională presupune experimente realizate *in vivo*, folosind organisme transgenice din diferite specii. Modelul experimental reprezentat de *D. melanogaster* este cu atât mai important pentru comunitatea științifică, cu cât obținerea de linii transgenice sofisticate nu este posibilă decât la un număr restrâns de organisme, unul dintre acestea fiind tocmai musculița de fructe.

3. TIPURI DE TRANSPOZONI ÎNTÂLNIȚI ÎN GENOMUL GENULUI *DROSOPHILA*

3.1 ELEMENTUL P

Cel mai studiat transpozon la *D. melanogaster* este elementul P (Ashburner, 1989), care are 2907 pb, iar la capete prezintă două repetiții inverse de câte 31 pb (Fig. 9)

Din punct de vedere funcțional, elementul P conține o singură genă, care codifică pentru transpozaza P, ce catalizează transpoziția elementului P. Această genă este transcrisă în toate țesuturile, rezultând un transcript primar major de 2,7 kb. Procesul de *splicing* al acestui transcript este însă diferit în linia germinală față de cel realizat în celulele somatice.

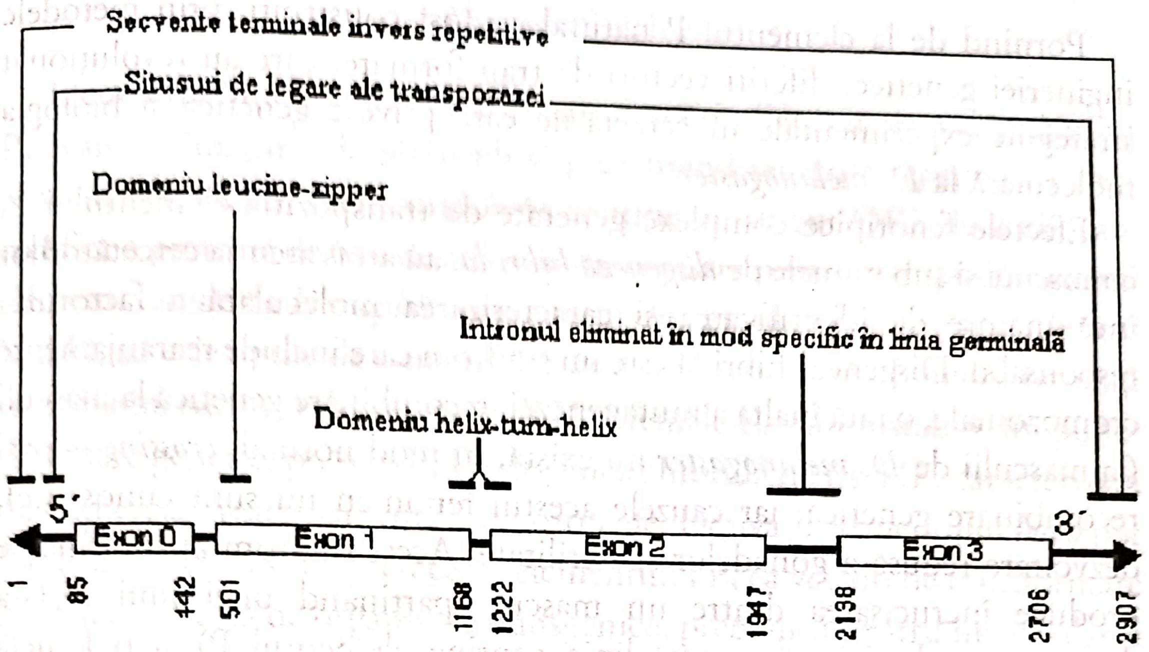

Secvente terminale invers repetitive
Situsuri de legare ale transpozazei
Domeniu leucine-zipper
Intronul eliminat în mod specific în linia germinală
Domeniu helix-turn-helix
5'
3'
Exon 0
Exon 1
Exon 2
Exon 3
1
85
442
501
1168
1222
1947
2138
2706
2907

Fig. 9 — Structura elementului P de la *D.melanogaster* (adaptare după Engels, 2000).

ARNm-ul din celulele germinale nu conține introni, este format din 4 exoni, numerotați 0, 1, 2 și 3 și codifică pentru o transpozază cu greutate moleculară de 87 kD. În celulele somatice, intronul dintre exonii 2 și 3 nu este eliminat. Acest intron conține un codon stop, ceea ce face ca proteina produsă în celulele somatice să fie incompletă (66 kD), astfel încât nu mai poate îndeplini funcția de transpozază, ci chiar inhibă transpoziția elementului P în acest tip de celule. *Splicing*-ul alternativ este responsabil de limitarea transpoziției elementului P doar la nivelul liniei germinale.

Elementele P defective, care prezintă diferite deleții, par să fie mobilizate mai ușor comparativ cu elementul P integral. Deasemenea, transpoziția este afectată de către mediul cromatinic și nu este randomică, astfel încât există loci *hot spot* pentru inserție (locusul singed, *sn*) și loci refractari la inserția elementului P (locusul alcool dehidrogenazei, *Adh*). Transpoziția elementului P poate fi conservativă sau non-conservativă și se poate realiza atât prin excizie precisă, cât și prin excizie imprecisă. La locul inserției, elementul P cauzează o duplicație de 8 pb a secvenței țintă, însă se cunosc și cazuri în care mărimea duplicației poate avea 2 pb sau 9 pb. S-a observat că elementul P tinde să se insere la capătul 5' al genelor și că, în mod frecvent, noul situs de inserție este în relativă vecinătate a celui inițial, în care elementul P original este conservat.

Pornind de la elementul P natural au fost construiți, prin metodele ingineriei genetice, diferiți vectori de transformare, care au revoluționat strategiile experimentale în cercetările care privesc genetica și biologia moleculară la *D. melanogaster*.

Efectele fenotipice complexe generate de transpoziția elementului P, cunoscute și sub numele de *disgeneză hibridă*, au atras atenția cercetătorilor încă înainte de identificarea și caracterizarea moleculară a factorului responsabil. Disgeneza hibridă este un sindrom care include rearanjamente cromozomale, o rată înaltă a mutagenezei, recombinare genetică la masculi (la masculii de *D. melanogaster* nu există, în mod normal, *crossing-over* și recombinare genetică, iar cauzele acestui fenomen nu sunt cunoscute), dezvoltare redusă a gonadelor și sterilitate. Acest sindrom apare când se produce încrucișarea dintre un mascul aparținând unei linii P (s-a demonstrat ulterior că această linie conține elementul P) și o femelă aparținând unei linii M (care nu conține elementul P). Încrucișările dintre un mascul dintr-o linie P sau M și o femelă dintr-o linie P nu determină disgeneza hibridă, ceea ce indică faptul că ovocitul, care conține mult mai multă citoplasmă decât spermatozoidul, trebuie să conțină un factor care inhibă transpoziția elementului P la nivelul zigotului. Deoarece femelele din liniile M nu prezintă elementul P, acestea nu produc factorul inhibitor al transpoziției, reprezentat, se pare, chiar de către proteina de 66 kD sintetizată în țesuturile somatice ale indivizilor care conțin elemente P funcționale. La femelele din liniile P, proteina inhibitoare este livrată ovocitului în timpul procesului de ovogeneză.

Se definesc astfel citotipurile P și M, care sunt corelate cu prezența sau absența factorului inhibitor P. Transpoziția se produce dacă sunt îndeplinite următoarele condiții: elementele P, chiar cele defective, conțin ambele capete invers repetate, există o sursă de transpozază și lipsește factorul inhibitor. Musculițele de fructe transgenice, transformate cu un element P din care a fost eliminat în mod artificial intronul dintre exonii 2 și 3, suferă fenomenul de transpoziție și în celulele somatice în prezența unei surse de transpozază, dar sunt incapabile să determine citotipul P, întrucât factorul inhibitor de 66 kD nu mai poate fi sintetizat.

3.2 ELEMENTUL *hobo*

Elementul funcțional *hobo* are o structură similară cu cea a elementului P, având o lungime de 3016 pb și prezentând secvențe terminale invers repetate, de 12 pb. Elementul *hobo* conține un singur ORF de 2 kb, care codifică o proteină de 644 de aminoacizi, necesară pentru transpoziția acestui element. Liniile de *Drosophila* care conțin elementul *hobo* integral se numesc linii H, iar cele lipsite de elementul *hobo* de numesc linii E. Indivizii rezultați în urma încrucișării dintre masculi H și femele E, sunt instabili din punct de vedere genetic, prezentând o disgeneză hibridă de tip HE, caracterizată de numeroase rearanjamente cromozomale. Derivații elementului *hobo* pot fi folosiți în mod similar cu cei ai elementului P, ca vectori de transformare pentru obținerea de organisme transgenice, precum și pentru manipularea unor regiuni ale genomului refractare la inserția elementului P.

3.3 ELEMENTUL *mariner*

Elementul *mariner* este similar ca structură cu elementele P și *hobo* (Ashburner, 1989). Acest transpozon a fost identificat datorită unor inserții somatice instabile în gena *white* de la specia *D. mauritania*. Spre deosebire de elementele P și *hobo*, care determină o instabilitate genetică limitată la celulele germinale, *mariner* induce instabilitate genetică în celulele somatice.

Din punct de vedere structural, *mariner* are o lungime de 1286 pb, prezintă terminații invers repetate de 28 pb și conține un singur ORF, care codifică pentru o proteină de 345 aminoacizi. Au fost identificate atât elemente *mariner* autonome, capabile să realizeze frecvent excizia și transpoziția, cum este *Mos1*, cât și elemente non-autonome, dar care pot transpoza în prezența lui *Mos1*.

Elementul *mariner* a fost introdus la *D. melanogaster* prin transgeneză și s-a constatat că transpozează mai frecvent în genomul acestei specii decât în cel al *D. mauritania*. Acest transpozon a fost deja utilizat pentru tehnica *transposon tagging* la *D. mauritania*, și se intenționează utilizarea unor vectori derivați din acesta pentru marcarea unor regiuni din genomul *D. melanogaster*, refractare la inserția altor elemente transpozabile.

3.4 ELEMENTUL *minos*

Elementul *minos* a fost identificat la *D. hidey*, are o lungime de 1775 kb, prezintă secvențe terminale invers repetate de 255 pb și conține două ORF-uri nesuprapuse, care codifică pentru două proteine distincte, de 153 aminoacizi și respectiv de 201 aminoacizi (Ashburner, 1989). Elementul *minos* este capabil să transpozeze în genomul de *D. melanogaster* dacă este injectat în embrioni împreună cu o sursă de transpozază, ceea ce sugerează dezvoltarea unor strategii experimentale care să facă uz de vectori de transformare derivați din acest element transpozabil.

3.5 RETROTRANSPOZONI DIN GENOMUL SPECIEI *D. melanogaster*

3.5.1 RETROTRANSPOZONUL gypsy

Elementul mobil *gypsy* este primul retrotranspozon detectat la nevertebrate, despre care se considera că nu conțin astfel de elemente transpozabile (Ashburner, 1989). Lungimea totală a retrotranspozonului este de 7469 pb, la capete prezintă două secvențe LTR de câte 482 pb, conține genele *gag*, *env* și *pol*, iar la nivelul situsului țintă inserția sa produce o duplicație de 4 pb. Se estimează că există circa 10 copii *gypsy* în genomul speciei *D. melanogaster*. Mobilizarea *gypsy* nu este dependentă de exprimarea acestuia la nivelul liniei germinale. Experimentele au demonstrat că *gypsy* are proprietăți infecțioase și că este de fapt un retrovirus. Expresia provirusului *gypsy* în celulele somatice ale femelei este necesară și suficientă pentru integrarea în linia germinală. Elementul *gypsy* se găsește în două forme: forma activă, care predomină în populațiile naturale și forma inactivă. Particulele mature *gypsy* sunt produse în prezența mutației *flam*, care derepresează activitatea genei *env* a retrotranspozonului. În unele stocuri, elementele active *gypsy* sunt întâlnite exclusiv în cromozomul Y, iar prezența alelei mutante *flam* pare să fie asociată cu acest fenomen.

Particulele VLP *gypsy* (virus-like particles) au fost identificate și în liniile celulare DH14 și DH33 de *D. hydei*.

3.5.2 ELEMENTUL I

Elementul *I*, asociat cu disgeneza hibridă de tip IR, are o structură similară cu elementele LINE de la mamifere. În forma completă, elementul I are o lungime de 5371 pb, nu prezintă terminații invers repetate și conține două ORF-uri, separate de o secvență de 72 pb; se pare că ORF2 codifică o reverstrascriptază (Ashburner, 1989).

3.5.3 ELEMENTELE copia-like

La *D. melanogaster*, aceste elemente sunt reprezentate de cel puțin 7 familii, care conțin retrotranspozoni a căror lungime variază între 5-8,5 kb (Ashburner, 1989). Membrii fiecărei familii apar în circa 10-100 de copii în genomul de *D. melanogaster*. Elementele *copia*-like, au o lungime medie de 5 kb și prezintă două secvențe identice, de 267 pb, localizate terminal și în aceeași orientare. Fiecare dintre aceste secvențe este flancată de două secvențe invers repetate, de câte 17 pb. Elementele *copia*-like prezintă similaritate structurală cu elementul *Ty* de la drojdii și conțin corespondenți ai genelor retrovirale *gag*, *int*, *env* și *pol*.

Foarte multe mutații de la *D. melanogaster* sunt consecința integrării elementelor *copia*-like în anumite gene. Un exemplu este mutația *white-apricot* (w^a), cauzată de inserția unui astfel de element în gena *white*.

3.5.4 RETROTRANSPOZONII HeT-A ȘI TART

La *Drosophila*, telomerele prezintă un model de organizare diferit de cel general acceptat, deoarece conțin elemente transpozabile specifice acestor structuri cromozomale, și anume retrotranspozonii HeT-A și TART. Acest fapt sugerează posibilitatea ca anumite elemente transpozabile parazite și chiar unele virusuri să fi evoluat prin mecanisme pe care celula eucariotă le utilizează pentru menținerea structurii cromozomilor (Pardue et al., 1996).

La protozoare, fungi, plante superioare, mamifere și chiar la unele insecte, capetele cromozomilor sunt extinse de către enzima *telomeraza* care, fiind o ribonucleoproteină, utilizează un segment de ARN din alcătuirea sa ca matriță, după care construiește lanțuri de ADN repetate în tandem la capetele fiecărui cromozom. Se pare că la *Drosophila* acest mecanism molecular lipsește, iar în locul repetițiilor în tandem există transpozonii HeT-A și TART, specifici pentru telomere, prezenți în mai multe copii și care sunt capabili să repare delețiile terminale ale cromozomilor. Repetițiile formate de către acești transpozoni sunt mult mai lungi și mai complexe decât repetițiile telomerice prezente la nivelul altor tipuri de cromozomi. Astfel, în timp ce repetițiile telomerice sunt foarte scurte, având între 5-8 pb la majoritatea organismelor, transpozonul HeT-A are circa 6 kb, iar TART are peste 10 kb.

Spre deosebire de celelalte tipuri de transpozoni, care au tendința de a transpoza relativ randomic și imprevizibil, producând în general mutații cu efect negativ asupra gazdei, traspozonii HeT-A și TART transpozează doar la nivelul capetelor cromozomale și au un efect pozitiv, stabilizator, asupra cromozomilor și implicit asupra genomului.

Descoperirea modelului structural excepțional al telomerelor la *D. melanogaster* implică revizuirea modelelor care descriu telomerele, transpozonii și heterocromatina. Astfel, cu toate că transpozonii specifici telomerelor sunt localizați exclusiv în regiuni heterocromatice, au fost detectați transcripți ai elementului HeT-A atât în culturile de celule, cât și în musculițele de fructe intacte, ceea ce demonstrează că la nivelul heterocromatinei există activitate genetică. În plus, se estimează că unele secvențe ale transpozonilor HeT-A și TART ar putea reprezenta motive structurale care contribuie la formarea heterocromatinei. Similaritatea între telomerele de la *D. melanogaster* și cele de la celelalte organisme studiate, constă în faptul că, în ambele cazuri, o enzimă extinde capătul cromozomului prin atașarea de ADN copiat după o matriță ARN. Dacă, în general, telomeraza utilizează ca matriță un fragment scurt din molecula de ARN ce intră în alcătuirea sa, la *D. melanogaster* această operațiune este realizată de către o reverstranscriptază care utilizează ca matriță întrega sa moleculă de ARN. În consecință, la *D. melanogaster* repetițiile telomerice apar tot în tandem, însă sunt mult mai lungi.

4. PARTICULARITĂȚI FUNCȚIONALE ALE GENOMULUI LA *D. melanogaster* CU IMPACT ASUPRA PROCESULUI DE DEZVOLTARE

4.1 MECANISME SPECIALE DE REGLAJ GENETIC

Procesul de dezvoltare presupune expresia a numeroase gene după un model temporal și spațial foarte precis. În principiu, genele se află sub controlul secvențelor *enhancer* (secvențe activatoare), plasate la distanțe de ordinul kilobazelor față de promotor. Unele gene implicate în diferite etape ale procesului de dezvoltare prezintă enhanceri multiplii, care activează expresia genică în țesuturi diferite.

Experimente recente efectuate pe *D. melanogaster* au demonstrat existența unor secvențe nucleotidice cu rol de izolatori cromatinici, care blochează interacțiunile enhancer-promotor. Izolatorii cromatinici furnizează date importante asupra modului în care enhancerii pot activa promotorii de la mari distanțe. Izolatorii cromatinici, blochează sau reduc activarea unui promotor atunci când sunt poziționați între acesta și enhancer. La *D. melanogaster* au fost descoperiți numeroși izolatori, cum sunt “structurile cromatinice specializate”, simbolizate *scs* si *scs*^{I} de la capetele clusterului genic *heat-shock* 87A7, izolatorul *gypsy* Su(Hw)-dependent, și secvența de delimitare *Fab*-7 din complexul genic *Bithorax* (Dorsett, 1999)

Izolatorii cromatinici de la *D. melanogaster* prezintă proprietăți comune. Astfel, toți izolatorii blochează enhanceri distincți care activează gene diferite, ceea ce sugerează că izolatorii cromatinici interferă cu mecanisme de activare comune pentru enhanceri distincți. Mai mult, enhancerii blocați experimental de către izolatorii cromatinici enumerați mai sus, pot activa un promotor aflat în direcție opusă și având polaritate inversă (promotor divergent). Aceste rezultate exclud posibilitatea ca izolatorii cromatinici să inactiveze enhancerii și proteinele activatoare legate de aceștia prin simpla formare a unei structuri cromatinice represive, ceea ce sugerează că izolatorii nu inactivează enhancerii și promotorii, ci intervin în comunicarea dintre aceștia.

S-a speculat că izolatorii mimează structura promotorului, astfel încât pot interacționa cu activatorii legați de enhancer, ceea ce ar însemna că izolatorii concurează cu promotorii pentru factorii de transcripție bazali, recrutați de către secvența activatoare. Experimentele indică însă faptul că izolatorii nu participă la o competiție pentru componentele mașinăriei transcripționale bazale. La *D. melanogaster* s-a evidențiat faptul că enhancerii pot activa în mod simultan doi promotori, dar în mod preferențial. Astfel, enhancerul AE1, poziționat relativ echidistant între promotorii genelor *Sex combs reduced* (*Scr*) și *fushi tarazu* (*ftz*), activează în mod preferențial promotorul genei *ftz*. Activarea altor promotori are loc atunci când promotorul *ftz* este deletat.

Atunci când enhancerul AE1 este clonat între promotorii divergenți *ftz* și *even-skipped* (*eve*), care conțin secvența TATA, ambii promotori sunt activați. Aceeași situație este observată atunci când AE1 este clonat între promotorii divergenți *white* și respectiv *P* (de la nivelul elementului P) și care nu conțin secvența TATA. În schimb, dacă enhancerul AE1 este poziționat între promotorii *eve* și *white,* promotorul *eve* este activat în mod preferențial, ceea ce înseamnă că promotorii care conțin secvența TATA interferă cu activarea promotorilor care nu conțin secvența TATA.

Experimente adiționale efectuate cu alți promotori și enhanceri confirmă faptul că secvența TATA, care este un situs de legare a factorilor bazali de transcripție, reprezintă un determinant important al activării preferențiale a unor promotori în detrimentul altora. Dacă doi promotori divergenți, între care se află plasat un enhancer, sunt fie lipsiți de secvența TATA, fie prezintă ambii secvența TATA, ei vor concura, determinând nivele similare de transcripție sub controlul aceleiași secvențe activatoare. Astfel, spre deosebire de izolatorii cromatinici, promotorii care conțin secvența TATA nu trebuie să fie plasați între enhancer și promotorul care nu are secvența TATA pentru a afecta activarea acestuia din urmă.

Deși izolatorii cromatinici nu se comportă ca și promotorii, s-a demonstrat recent că anumiți promotori pot acționa ca izolatori. Astfel, atunci când promotorul *eve* este plasat între un enhancer și un al doilea promotor plasat în aval, el va bloca activarea promotorului din aval, chiar dacă acesta conține secvența TATA. Alți promotori studiați nu prezintă acest tip de comportament, ceea ce indică faptul că promotorul *eve* ar conține un izolator cromatinic.

Izolatorii cromatinici afectează comunicarea enhancer-promotor fără a inactiva enhancerii și fără a concura cu promotorii pentru recrutarea factorilor de transcripție. Pentru a explica aceste date științifice, a fost propus un model care presupune existența unor factori de facilitare, care funcționează între enhanceri și promotori și care formează structuri care aduc enhancerul și promotorul în vecinătate. În cadrul acestui model, izolatorii cromatinici interferă cu factorii de facilitare și blochează comunicarea dintre enhancer și promotor.

Ipoteza factorilor de facilitare se bazează pe pricipiul că un enhancer trebuie să fie în proximitatea fizică a unui promotor pentru a putea recruta mașinăria bazală de transcripție. În unele situații promotorul de pe un cromozom poate fi activat de către un enhancer plasat în cromozomul omolog corespunzător. Experimentele legate de activarea intercromozomală a genei *yellow*, subliniază importanța proximității enhacerului față de promotor și sugerează că pot exista mecanisme alternative prin care enhancerii sunt aduși în vecinătatea promotorilor.

Gena *yellow* determină pigmentarea cuticulei, a aripilor și a perișorilor și prezintă enhanceri pentru fiecare țesut. Alela *yellow*^{2} conține o inserție a retrotranspozonului *gypsy* care izolează enhancerii activi în aripi și în cuticulă, însă nu afectează enhancerii activi în perișori. Mutanții *yellow*^{2} prezintă un fenotip alterat la nivelul aripilor și cuticulei, însă pigmentarea perișorilor este normală. Când alela *yellow*^{2} este în condiție heterozigotă cu o altă alelă *yellow* care prezintă alterări ale promotorului (cazul alelei *yellow* $^{1\#8}$), apare complementația intragenică, astfel încât pigmentația aripilor și a cuticulei revine la normal (Dorsett, 1999).

Ideea că enhancerii specifici pentru aripi și pentru cuticulă din alelele *yellow* fără promotor pot activa promotorul alelei *yellow*^{2} plasate pe cromozomul omolog, este susținută de observația că rearanjamentele cromozomale blochează fenomenul de complementație. Dovada clară a faptului că enhancerii activi în cuticulă și în aripi pot activa promotorul plasat în *trans* pe cromozomul omolog, este furnizată de observația că alela *yellow*^{82f29}, care nu are enhancerii respectivi, dar care are un promotor activ, este complementată pentru expresia normală a enhancerilor specifici pentru cuticulă și aripi de alela *yellow*$^{1\#8}$, care are cei doi enhanceri dar care nu are promotorul.

4.2 ELEMENTE DE GENETICA DEZVOLTĂRII LA *D. melanogaster*

Pentru construirea unor organisme cu fenotip normal, este esențială determinarea spațiilor sau teritoriilor organismului în care se exprimă diferitele gene din alcătuirea genomului. La fel de importantă este și reglarea temporală a activității genice. Astfel, unele gene sunt active pe toată durata vieții organismului respectiv, în timp ce altele sunt funcționale doar în anumite perioade, de regulă în etapele succesive ale procesului de dezvoltare. În timpul procesului de embriogeneză la *D. melanogaster*, diferite categorii funcționale de gene ale embrionului intră în acțiune în mod succcesiv, una sub controlul celeilalte, conturând în mod gradat arhitectura viitorului organism. Există astfel o ierarhie temporală a activității genice, în cadrul căreia fiecare genă se comportă ca și cum ar fi conectată la un ceas molecular, care indică momentul activării genei respective.

În plus, mutațiile care afectează specificitatea spațială a exprimării genice conduc la activarea unor gene în celule în care, în mod normal, genele respective sunt represate (*exprimare ectopică*), sau reciproca. Activarea sau represarea în coordonate spațio-temporale atipice, a unor gene sau grupuri de gene interconectate funcțional în timpul procesului de dezvoltare la *D. melanogaster*, determină apariția unor fenotipuri mutante spectaculoase. Studiul acestor mutații a creat premizele elucidării unor raporturi dintre organizarea structural-funcțională a genomului și coordonata timp, prin descoperirea unor categorii de gene care funcționează în timpul procesului de dezvoltare după ierarhii bine stabilite, în cadrul unor rețele informaționale deosebit de complexe. Aceste categorii de gene sunt: *genele maternale, genele zigotice* și *genele homeotice selectoare*.

4.2.1 GENE CU EFECT MATERN (*maternal-effect genes*)

Genele maternale (*maternal-effect genes*) funcționează la nivelul organismului matern și sunt esențiale pentru echiparea ovocitului cu determinanții moleculari ai viitoarelor axe spațiale (Gilbert, 1994). Aceste gene afectează stadiile inițiale ale dezvoltării prin intermediul produșilor, care sunt sintetizați la nivelul celulelor nutritive ale camerei ovocitare, după care sunt livrați ovocitului în timpul procesului de ovogeneză.

Imediat după fertilizarea ovocitului la *D. melanogaster*, au loc diviziuni mitotice care nu sunt urmate de citochineză, ceea ce duce la formarea unui embrion sincițial. Nucleii formați migrează la periferia embrionului, unde invaginările membranei produc celularizarea acestuia, generând blastodermul. Primele celule noi ale embrionului se formează la capătul posterior al acestuia și sunt reprezentate de **celulele polare**, care au rolul de **celule stem** ale liniei germinative. În cazul femelelor, celulele stem se localizează la nivelul ovarului adultului și reprezintă precursorii viitoarelor ovocite.

Citoplasma de la polul posterior al ovocitului este denumită **plasma germinativă** sau **plasmă polară posterioară**. La *D. melanogaster*, plasma germinativă este marcată de prezența **granulelor polare** (alcătuite din proteine și ARN) și are o structură biochimică particulară, care face ca nucleii sincițiului embrionar care ajung la polul posterior al embrionului să își piardă totipotența și să devină nucleii viitoarelor celule polare.

În cazul genelor maternale, fenotipul descendenților nu depinde de propriul genotip, ci de genotipul matern. Mutațiile recesive în genele maternale (mult mai numeroase decât cele dominante) sunt ușor de identificat, deoarece femelele homozigote pentru astfel de mutații produc ovocite incapabile să găzduiască un proces de embriogeneză normal, în timp ce masculii mutanți homozigoți produc spermatozoizi funcționali.

Embrionii de *D. melanogaster* afectați de mutații la nivelul oricăreia dintre genele maternale *cappucccino*, *spire*, *staufen*, *oskar*, *vasa*, *valois* și *tudor*, sunt incapabili să producă celule germinative, iar abdomenul lipsește la mutanții respectivi, sau este incomplet. Aceste gene sunt active în ovar, iar produșii lor sunt livrați ovocitului de către celulele nutritive. Experimentele de localizare *in situ* a produșilor acestor gene a permis stabilirea unei ierarhii funcționale a produșilor genici respectivi. S-a demonstrat că proteinele codificate de către genele *cappuccino* și *spire*, sunt indispensabile pentru localizarea posterioară, în ovocit, a proteinei *staufen*. Femelele mutante pentru genele *cappuccino* și *spire*, produc ovocite care nu conțin proteina *staufen* localizată la polul posterior, ceea ce afectează localizarea posterioară a ARNm *oskar*. Proteina oskar, produsă prin translația ARNm *oskar* este necesară, la rândul său, pentru localizarea posterioară a proteinei *vasa*, care intră în alcătuirea granulelor polare. Mutațiile genelor *valois* și *tudor* nu influențează localizarea proteinei *vasa*, însă contribuie la menținerea structurii plasmei polare.

Localizarea ARNm *oskar* la polul posterior al ovocitului, induce ansamblarea plasmei polare, responsabilă de formarea abdomenului viitorului embrion, precum și de dezvoltarea liniei celulare germinale. ARNm *oskar* este sintetizat în celulele nutritive ale camerei ovocitare, după care este distribuit uniform în citoplasma ovocitului. Embrionii care se dezvoltă din ovocite care nu conțin ARNm *oskar* (mutante nule), sau în care ARNm *oskar* nu este localizat corespunzător la nivelul polului posterior, nu prezintă abdomen și nu au celule ale liniei germinale. În plus, localizarea ectopică a ARNm *oskar* la nivelul polului anterior al ovocitului, induce apariția abdomenului în regiunea anterioară și formarea de celule germinale în locul capului.

Aceste fenotipuri mutante demonstrează rolul esențial al genei *oskar* în ansamblarea plasmei polare și în formarea liniei germinative. Translația ARNm *oskar* este cuplată cu localizarea sa, sinteza proteinei *oskar* neavând loc în embrionii la nivelul cărora ARNm *oskar* nu este localizat corespunzător. Menținerea localizării ARNm *oskar* la polul posterior este dependentă atât de prezența proteinei *oskar*, ceea ce sugerează un mecanism de control reglator de tip *feed-back*, cât și de unii componenți ai plasmei polare, cum ar fi proteinele *vasa* și *tudor*. Investigarea rolului proteinei *oskar* în formarea plasmei polare, a evidențiat faptul că această proteină interacționează în mod direct cu proteinele *staufen* și *vasa*, iar interacțiunea *oskar-vasa* este considerată un prim pas în organizarea granulelor polare.

În ovocitul de *D. melanogaster*, localizarea multor specii de ARN este dependentă de structura citoscheletului. Localizarea corectă a ARNm *oskar* este dependentă de integritatea structurală a microtubulilor, după cum indică experimentele efectuate cu inhibitori ai polimerizării microtubulilor. S-a demonstrat că regiunea 3'UTR a ARNm *oskar*, conține atât semnale necesare localizării ARNm *oskar* la polul posterior, cât și semnale necesare pentru realizarea translației (Gunkel).

O cale eficientă de localizare și de concentrare a proteinelor la nivelul ovocitului se realizează prin represarea translației moleculelor de ARNm până la localizarea corectă a acestora. În cazul ARNm *oskar*, blocarea translației este dependentă de o secvență represoare, identificată la nivelul regiunii 3'UTR a acestuia. Derepresarea translației este un proces activ, care presupune interacțiunea dintre o regiune derepresoare, prezentă în regiunea 5' a ARNm *oskar* și secvența represoare. Regiunea derepresoare își îndeplinește funcția doar la polul posterior al ovocitului, unde se pare că interacționează cu o proteină capabilă să recunoască și secvența represoare 3'.

De-a lungul viitoarei axe antero-posterioare embrionare este distribuită o informație pozițională, care constă în existența unui gradient de concentrație a factorului de transcripție **bicoid**, codificat de către gena maternală *bicoid* (*bcd*) și în localizarea la polul posterior a proteinei **nanos**, codificată de către gena maternală *nanos* (*nos*). În timpul ovogenezei, ovocitul este echipat de către celulele nutritive cu ARNm *bicoid*, iar procesul de translație are loc după momentul fecundației. Moleculele de ARNm *bcd*, sunt ancorate de capătul minus al microtubulilor, aflat la polul anterior al ovocitului. Sinteza proteinei *bicoid* are loc în timpul primelor diviziuni nucleare ale sincițiului embrionar, proteina difuzând în citoplasma comună. Deoarece proteina *bicoid* este un factor de transcripție, aceasta va fi localizată intranuclear. Evident, nucleii care se află mai aproape de polul anterior, adică de originea translației, vor conține această proteină într-o concentrație mai mare decât nucleii plasați către zona centrală a embrionului. În felul acesta este stabilit un gradient de concentrație intranucleară a proteinei *bicoid*, de-a lungul jumătății anterioare a embrionului. Femelele homozigote pentru mutația genei *bicoid* produc embrioni care nu au cap și stucturile toracice.

ARNm *nos* este localizat la capătul posterior al embrionului, fiind ancorat (prin intermediul regiunii 3' UTR, dar indirect) de capătul plus al microtubulilor. Embrionii proveniți din femele mutante homozigote *nanos*, conțin un număr normal de celule polare, însă au abdomenul incomplet dezvoltat.

4.2.2. GENE ZIGOTICE

Spre deosebire de genele maternale, care intervin în embriogeneză dar sunt transcrise în organismul matern, așa-numitele *gene zigotice* sunt transcrise în embrion, ceea ce permite declanșarea etapei autonome a procesului de dezvoltare la *D. melanogaster* (Gilbert, 1994) Relația funcțională dintre aceste două categorii de gene constă în faptul că genele maternale stabilesc la nivelul ovocitului un model informațional spațio-temporal, care este recunoscut și interpretat de către genele zigotice. Au fost identificate trei categorii de gene zigotice și anume: genele *gap*, genele *pair-rule* și genele polarității segmentelor.

4.2.3. GENE ZIGOTICE GAP (GAP GENES)

Aceste gene zigotice se numesc astfel (*gap* = lipsă, absență), deoarece mutațiile la nivelul lor conduc la dispariția unor segmente ale embrionului. Genele *gap* sunt exprimate la circa două ore după momentul fecundației, înainte de celularizarea embrionului care, inițial, se dezvoltă ca un sincițiu. Produșii genelor *gap* sunt factori de transcripție (Gilbert, 1994).

Prima gena *gap* exprimată în embrion este gena *hunchback*, iar proteina *hunchback* este un factor de transcripție care activează sau represează numeroase alte gene, incluzând genele *gap Krupple* și *knirps*. La rândul lor, aceste gene codifică factori de transcripție, care controlează evenimente ulterioare din embriogeneză.

Domeniile de exprimare ale genelor *gap* sunt parțial suprapuse, aceste gene acționând într-o manieră combinatorie, care le permite controlul asupra unor gene zigotice subordonate funcțional, și anume genele *pair-rule*.

4.2.4. GENE ZIGOTICE PAIR-RULE

Genele maternale și genele *gap* determină împreună polaritatea embrionului și controlează formarea unor regiuni embrionare largi, în interiorul cărora se desfășoară evenimente ulterioare ale procesului de dezvoltare. Pe măsură ce acest proces progresează, are loc o rafinare progresivă a organizării embrionare, corelată cu exprimarea ierarhică a genelor *pair-rule* și a genelor polarității segmentelor (Gilbert, 1994).

Mutațiile în genele *pair-rule* determină absența unor segmente sau fenotipul anormal al acestora, după un model alternativ. Astfel, mutațiile genei *even-skipped* afectează segmentele embrionare numerotate cu număr par, iar mutațiile genei *odd-skipped* afectează segmentele cu număr impar.

Se consideră că funcția principală a genelor *pair-rule* este de a conferi larvei timpurii de *D. melanogaster* un model segmentat al corpului, în care segmentele prezintă semne incipiente de individualizare. Modelele combinate de exprimare a genelor *pair-rule*, definesc domeniile de exprimare în timpul embriogenezei a genelor zigotice subordonate din ierarhia funcțională și anume a *genelor polarității segmentelor*. În afară de reglarea activității genelor polarității segmentelor, produșii genelor *pair-rule* colaborează cu produșii *genelor gap*, pentru a determina activarea precis localizată a *genelor homeotice selectoare*.

4.2.5. GENE ZIGOTICE ALE POLARITĂȚII SEGMENTELOR (SEGMENT-POLARITY GENES)

Genele polarității segmentelor controlează polaritatea segmentelor și diferențierea celulară în interiorul fiecărui segment (Gilbert, 1994). Una dintre genele din această categorie este gena *engrailed*, a cărei activitate divide segmentele într-o regiune anterioară și o regiune posterioară. Genele polarității segmentelor sunt exprimate în stadiul de blastoderm al embrionului

4.3. GENE HOMEOTICE SELECTOARE

Descoperirea genelor homeotice a fost favorizată de identificarea unor mutante precum *Bitorax* și *Antennapedia*. La musculițele de fructe cu mutația *Bitorax* segmentul toracic 3, care în mod normal prezintă o pereche de *haltere*, este transformat într-un duplicat al segmentului toracic 2 și are o pereche de aripi, deoarece mutanții nu produc factorul de transcripție codificat de gena *Ultrabitorax*, care represează formarea aripilor în segmentul toracic 3. La mutanții *Antennapedia*, se dezvoltă o pereche de picioare la nivelul capului, în locul antenelor. Astfel de mutații bizare, care determină segmentele corpului insectei să se dezvolte ca și cum acestea ar fi greșit informate asupra destinului lor morfologic și funcțional, definesc clasa *genelor homeotice selectoare*. Mutațiile la nivelul genelor homeotice selectoare se numesc mutații homeotice și determină **homeoza**, adică apariția într-o regiune a corpului a unor structuri care sunt caracteristice unei alte regiuni a corpului. Se observă că, în cazul mutațiilor homeotice, numărul segmentelor corpului rămâne constant, dar se modifică identitatea morfologică a segmentelor afectate de aceste mutații.

La *D. melanogaster* genele homeotice selectoare sunt grupate în două complexe genice localizate în cromozomul 3, și anume complexul *Antennapedia* (ANT-C) și complexul *Bitorax* (BX-C). Genele complexului *Bitorax* controlează diferențele dintre segmentele toracice și segmentele abdominale ale corpului, iar genele complexului *Antennapedia* controlează diferențele dintre segmentele toracice și segmentele capului.

Complexul ANT-C conține 5 gene (3' *lab*, *pb*, *Dfd*, *Scr* și *Antp* 5'), iar complexul BX-C conține 3 gene (3' *Ubx*, *abd-A și Abd-B* 5'). O caracteristică spațială deosebit de interesantă a regiunilor genomice reprezentate de către complexele homeotice, este fenomenul de **colinearitate** (Gilbert, 1884). Astfel, aranjamentul spațial al genelor homeotice la nivel cromozomal este perfect corelat cu succesiunea spațială a domeniilor de exprimare ale fiecăreia dintre aceste gene. De exemplu, genele homeotice plasate mai aproape de centromer, controlează dezvoltarea structurilor capului, iar genele plasate spre extremitatea cromozomului sunt responsabile, în mod succesiv, de determinarea segmentelor progresiv posterioare ale organismului. Semnificația biologică a fenomenului de colinearitate nu este elucidată, iar corelarea acestei colinearității spațiale cu o eventuală colinearitate temporală este cu atât mai interesantă. *Genele homeotice selectoare* au corespondenți în întreg regnul animal, ceea ce reflectă existența unui model general de reglare a procesului de dezvoltare la animale.

Produșii *genelor homeotice selectoare* sunt factori de transcripție care controlează activitatea altor gene implicate în procesul de dezvoltare. Genele homeotice selectoare conțin o **secvență homeobox** înalt conservată, de 180 pb, care codifică pentru un **homeodomeniu** de 60 de aminoacizi, ce conferă proteinelor corespunzătoare capacitatea de a se lega specific de molecula de ADN.

Ca și genele segmentării, genele homeotice selectoare sunt activate pentru prima oară în stadiul de blastoderm al embrionului, însă sunt considerate o categorie distinctă de cea a genelor zigotice.

5. ASPECTE GENETICE IN DETERMINAREA SEXULUI LA *D. melanogaster*

Mecanismul XX-XY de determinare a sexului, implică asocierea cromozomului Y cu sexul mascul. La organismele care prezintă un astfel de tip de determinare sexuală, prezența cromozomului Y declanșează anumite evenimente în dezvoltarea embrionului, care conduc la apariția sexului mascul.

La musculița de fructe, deși cromozomul Y este asociat cu masculinitatea, acesta nu determină prin el însuși caracterul de mascul. Astfel, embrionii XXY, generează femele fertile și normale din punct de vedere morfologic, în timp ce embrionii X0 devin masculi normali din punct de vedere morfologic, dar sunt sterili. Sterilitatea masculilor X0 demonstrează că, deși cromozomul Y nu este necesar pentru dezvoltarea masculului, este esențial pentru fertilitatea acestuia. De fapt, cromozomul Y de la *D. melanogaster* conține șase gene necesare pentru producerea de spermatozoizi funcționali (Hartl, 1998).

Determinarea genetică a sexului la *D. melanogaster* depinde de numărul de cromozomi X pe care îi conține un individ, raportat la numărul seturilor de autozomi. Un set de autozomi este notat, în mod convențional, cu A. Musculițele diploide normale, au două seturi haploide de autozomi, plus doi cromozomi X la femele și un cromozom X și unul Y la masculi. Astfel, la masculi raportul dintre numărul cromozomilor X și numărul seturilor de autozomi este 0,5 iar la femele acest raport este 1.

Diferențierea sexuală la *D. melanogaster* este controlată de gena *Sex-lethal* (*Sxl*). La musculițele care au un raport cromozomal X : A = 1, proteina funcțională SXL este sintetizată și organismul respectiv se dezvoltă ca femelă, iar la musculițele la care raportul X : A = 0,5 proteina funcțională SXL nu este produsă; în consecință, organismul respectiv se dezvoltă ca mascul.

La *D. melanogaster* nu are loc inactivarea prin heterocromatinizare a unuia dintre cei doi cromozomi X de la femelă, compensația de dozaj realizându-se prin stimularea puternică a activității genelor prezente în unicul cromozom X de la mascul.

6. EFECTUL DE POZIȚIE LA *D. melanogaster*

În timpul rearanjamentelor cromozomale de tipul translocațiilor și inversiilor, genele aflate în vecinătatea punctelor de rupere a cromozomilor pot fi relocate în genom, astfel încât ajung fie în vecinătatea altor gene, fie în alt mediu cromatinic, respectiv în vecinătatea sau chiar în interiorul unor regiuni heterocromatice. În astfel de situații, se manifestă **efectul de poziție**, care constă în modificarea nivelului de exprimare a genei repoziționate, sau chiar în blocarea activității genei respective. La *D. melanogaster*, aspectul fenotipic cel mai frecvent întâlnit ca o consecință a efectului de poziție, este reprezentat de culoarea variegată a ochilor, care devin un mozaic de celule normale, în care se exprimă alela normală *white*, și celule mutante, în care alela normală este inactivată. Fenomenul care duce la apariția ochilor variegați se numește *variegare datorată efectului de poziție* (**PEV**, *position-effect variegation*).

Masculii care suferă PEV datorită unor rearanjamente ale cromozomului X ce repoziționează gena *white* în mediu heterocromatinic, prezintă ochi mozaicați, cu fațete albe și roșii-cărămizii (fig. 10).

Același fenotip se observă și în cazul femelelor heterozigote, care conțin un astfel de cromozom X rearanjat și un cromozom X ce prezintă alela mutantă a genei *white*. Modelul de exprimare al alelei normale este dat de clonele celulare de la nivelul ochiului. Astfel, celulele dintr-o arie oculară de culoare roșie, derivă dintr-o singură celulă embrionară primordială, în

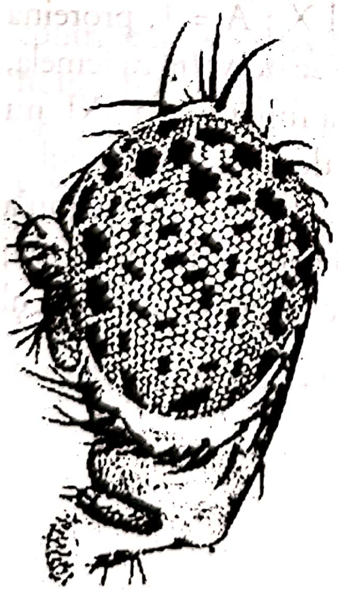


Fig. 10 — Fenotipul PEV la nivelul ochiului de *D. melanogaster* (adaptare după Suzuki et al., 2000)

care alela normală era activă. Celulele din fiecare zonă de culoare albă derivă dintr-o singură celulă embrionară, în care alela normală fie a fost inactivată prin PEV fie este înlocuită de alela defectivă w^-.

Se pare că mecanismul PEV are la bază interferența dintre gena relocată și heterocromatina în vecinătatea sau în interiorul căreia a fost repoziționată gena. Când are loc juxtapunerea eucromatinei și heterocromatinei, starea condensată caracteristică heterocromatinei se extinde parțial asupra genei afectate. Lungimea regiunii eucromatice care poate fi inactivată este cuprinsă între 1-50 de benzi dintr-un cromozom politen, ceea ce la nivel molecular se traduce într-un interval de 20-1000 kb.

Extinderea parțială a stării de condensare a cromatinei nu este continuă în regiunea eucromatică afectată de PEV. La *D. melanogaster* s-a observat că în unele regiuni afectate de PEV există o alternanță neregulată de gene active și gene inactivate.

Heterocromatina diferiților cromozomi variază în ceea ce privește capacitatea de a induce variegarea unor gene specifice și răspunde diferit la influența unor factori de mediu precum temperatura. Au fost identificate și numeroase mutații care afectează structura cromatinei și care au ca efect supresarea PEV.

Inactivarea genelor datorită schimbării poziției acestora în genom se poate produce și altfel decât prin PEV. De exemplu, activitatea unei gene relocate la nivelul eucromatinei poate fi afectată de genele care o flanchează. Acest tip de inactivare este tot o consecință a schimbării mediului cromatinic, însă la *D. melanogaster* majoritatea genelor se exprimă indiferent de genele învecinate, doar nivelul de exprimare putând să varieze considerabil.

7. METODE ALE INGINERIEI GENETICE UTILIZATE ÎN ANALIZA GENOMULUI LA *D. melanogaster*

Studiul genomului la *D. melanogaster* a fost puternic stimulat de obținerea de indivizi transgenici. Pentru obținerea acestora, se utilizează mai multe tipuri de vectori de transformare, derivați din elementul P, dintre care cei mai cunoscuți sunt vectorii din seria *pCaSpeR*. Un astfel de vector conține: o regiune polilinker, gena marker *mini-white*$^+$, necesară identificării indivizilor care au suferit inserția, și un fragment dintr-un vector de clonare plasmidial (pUC8), echipat cu originea replicării și cu gena de rezistență la ampicilină, în vederea amplificării în celula bacteriană. Aceste secvențe sunt încadrate de capetele invers repetate ale elementului P, indispensabile pentru transpoziție. Vectorii de transformare utilizați în tehnici precum *enhancer trapping*, conțin și gena reporter *lacZ*, aflată sub influența unui promotor cu activitate redusă, dar care poate fi stimulat atunci când vectorul de transformare se inseră în vecinătatea funcțională a unui enhancer din genomul gazdei.

Vectorii derivați din elementul P nu conțin gena care codifică transpozaza, astfel încât aceștia trebuie co-injectați în embrioni împreună cu o plasmidă helper, care permite transpoziția deoarece conține gena respectivă. Pentru mobilizarea inserțiilor, liniile transgenice de *D. melanogaster* pot fi încrucișate cu o linie modificată genetic, care prezintă gena pentru transpozază inserată stabil în genom.

7.1 TEHNICA *ENHANCER TRAPPING*

Tehnica *enhancer trapping*, permite identificarea și clonarea unor gene care prezintă un model de expresie tipic pentru un anumit țesut, sau pentru o anumită etapă de dezvoltare. Această metodă are o mare aplicabilitate în clonarea genelor implicate în procesul de dezvoltare la *D. melanogaster*. În acest scop, se obțin musculițe transgenice prin injectarea embrionilor dintr-o linie cu *background* genetic *w^-* cu un vector de transformare. Indivizii care au suferit inserții randomice la nivelul genomului (transpozanții), vor fi recunoscuți după culoarea ochilor, care variază între galben și roșu, spre deosebire de indivizii în al căror genom nu s-a inserat derivatul elementului P și care vor avea ochii albi, datorită *background*-ului genetic *w^-*. Gena marker *mini-white$^+$* din vectorul de transformare este sensibilă la efectul de poziție, astfel încât nivelul expresiei genice și implicit culoarea ochilor variază în funcție de mediul cromatinic în care s-a inserat vectorul.

Tratamentul organismelor transgenice cu substratul cromogen *X-Gal*, relevă modele diferite de colorare în albastru la nivel tisular, care relevă activitatea unor secvențe enhancer specifice pentru țesuturile respective. Metoda se bazează pe posibilitatea ca inserția randomică să plaseze vectorul de transformare în interiorul sau în imediata vecinătate a unei gene care, la rândul său, se află sub controlul unui enhancer ce controlează exprimarea genei după un model spațio-temporal specific. Gena *lacZ* din vectorul de transformare va fi activată de enhancer-ul respectiv după același model spațio-temporal după care este exprimată gena pe care enhancer-ul o activează în genomul musculiței de fructe. Astfel, dacă se urmărește clonarea unor gene noi implicate în ovogeneză, se aleg transpozanții care prezintă, după tratamentul cu *X-Gal*, regiuni colorate în albastru la nivelul ovarelor, se extrage ADN genomic și se izolează prin tehnica *plasmid rescue* sau prin tehnica *inverse PCR* secvențele genomice care flanchează vectorul de transformare inserat. Aceste secvențe sunt folosite pentru construirea de probe marcate, cu care se realizează *screening*-ul băncilor de ADN genomic, în vederea identificării de gene implicate în procesul de ovogeneză.

7.2 TEHNICI DE DETECTARE A MUTAGENEZEI INSERȚIONALE

Izolarea de mutații nule în gene deja clonate și caracterizate, creează premizele pentru efectuarea de experimente de transgeneză cu vectori care conțin fie varianta normală a genei de interes, fie fragmente ale acesteia, în vederea restaurării fenotipului normal. Ca urmare, inducerea și detectarea de mutații în gene care au fost deja clonate, prezintă un interes deosebit.

7.2.1 DETECTAREA PRIN TEHNICA PCR A MUTAGENEZEI INSERȚIONALE ÎNTR-O GENĂ DE INTERES

Inserția unui construct derivat din elementul P în genomul speciei *D. melanogaster* produce mutații inserționale și marchează regiunea genomică afectată cu o secvență de ADN deja cunoscută (*transposon tagging*), care permite detecția inserției prin tehnica PCR. ADN genomic extras de la transpozanții care prezintă mutații presupuse a fi avut loc în gena de interes este analizat prin tehnica PCR, folosind un primer corespunzător derivatului elementului P și un primer complementar cu o anumită secvență din gena de interes. În mod teoretic, produsul PCR nu este obținut decât atunci când inserția a avut loc în gena de interes sau în relativa vecinătate a acesteia (la o distanță medie de circa 1,5-2 kb) (Wolfner et al., 1994).

Dacă rezultatul aplicării tehnice PCR demonstrează că derivatul elementului P s-a inserat în gena de interes sau în apropiere, acesta va putea fi remobilizat pentru obținerea unei serii de alele ale genei respective. Noile alelele sunt obținute fie datorită tendinței elementului P de a se reinsera în imediata vecinătate a situsului inițial de inserție, fie grație fenomenului de excizie imprecisă, care determină producerea de deleții, cu posibilitatea de a genera mutații nule în gena afectată de inserția inițială.

În acest mod, se poate realiza mutageneza de saturație într-o anumită regiune cromozomală. Din păcate, mutageneza inserțională nu poate fi însă un standard pentru mutageneza țintită, deoarece unele locusuri din genomul speciei *D. melanogaster* sunt refractare la inserția elementului P.

7.2.2 TEHNICILE PLASMID RESCUE ȘI INVERSE PCR

La *D. melanogaster*, secvențele de ADN genomic adiacente inserțiilor vectorilor de transformare derivați din elementul P pot fi caracterizate fie prin tehnica *plasmid rescue*, fie prin tehnica *inverse PCR*. Cele două metode sunt echivalente, în sensul că se bazează pe restricția genomului organismului transgenic de interes, ligarea intramoleculară a fragmentelor rezultate și selectarea acelor molecule circulare de ADN care conțin o porțiune din vectorul de transformare și secvența de ADN genomic adiacentă (restrictaza utilizată taie într-o regiune cunoscută în interiorul vectorului de transformare, asigurând păstrarea genei de rezistență la antibiotic din structura vectorului, și respectiv randomic în genom). În cazul tehnicii *plasmid rescue*, selecția se face prin transformarea unor bacterii competente cu mixtura de molecule circulare obținută prin reacția de ligare, urmată de cultivarea bacteriilor transformate în prezența antibioticul corespunzător genei de rezistență din structura vectorului de transformare. Bacteriile care se dezvoltă în acest mediu conțin o moleculă circulară de ADN echivalentă cu o plasmidă, de unde și numele tehnicii. După extracția ADN-ului plasmidial prin tehnica *mini-prep*, se folosesc primeri corespunzători capătului vectorului de transformare (cuprins în stuctura noii plasmide) și se procedează la secvențierea ADN genomic adiacent (Hamilton et al., 1994).

Tehnica *inverse PCR* este mai simplă, în sensul că însăși utilizarea a doi primeri orientați cu capetele 3' în direcții opuse și complementari cu secvențe apropiate din regiunea capătului 3' sau 5' al vectorului de transformare, asigură selecția moleculelor circulare de ADN care conțin fsecvențe genomice ce flanchează unul dintre capetele insertului. Pornind de la aceste molecule și utilizând primeri de secvențiere complementari cu capătul respectiv al vectorului de transformare, se obține secvența de ADN genomic în care a avut loc inserția derivatului elementului P. Avantajul tehnicii *inverse PCR* este acela că nu necesită utilizarea bacteriilor, însă metoda trebuie optimizată în cazul fiecărui experiment, pentru a evita obținerea produșilor de amplificare nespecifici.

7.3 STUDIUL EXPRESIEI ECTOPICE A GENELOR LA *D. melanogaster*

Expresia ectopică a genelor la *D. melanogaster* prezintă un mare interes pentru cercetările privind genetica dezvoltării. Prin activarea în anumite celule a unor gene care, în mod normal, sunt represate în celulele respective, se pot declanșa fenomene deosebit de interesante, cum ar fi dediferențierea sau modificarea direcției de diferențiere a celulei respective. În acest scop, au fost puse la punct mai multe metode, bazate pe utilizarea unor vectori de transformare derivați din transpozonul P.

7.3.1 EXPRIMAREA ECTOPICĂ A UNEI GENE DE INTERES SUB INFLUENȚA PROMOTORULUI UNEI ALTE GENE

Metoda constă în plasarea unei gene a cărei expresie ectopică prezintă interes, în vecinătatea unui promotor aparținând altei gene și care este activ numai în anumite țesuturi. Indivizii transformați cu acest construct vor exprima gena de interes exclusiv în țesuturile în care este activ promotorul, ceea ce permite studiul interferențelor dintre expresia ectopică a unei gene și expresia genelor active în mod normal în țesutul respectiv. Metoda a fost deja aplicată în studiul formării ochiului la *D. melanogaster*, însă este limitată de clonarea și caracterizarea unor promotori care direcționează expresia genică după modelul dorit.

7.3.2 EXPRIMAREA ECTOPICĂ A UNEI GENE DE INTERES SUB INFLUENȚA UNUI PROMOTOR INDUCTIBIL PRIN ȘOC TERMIC

Această tehnică are la bază realizarea unui construct care plasează gena de interes sub controlul unui promotor *heat-shock*, ceea ce permite ca gena de interes să fie activată în oricare etapă a dezvoltării, prin expunerea organismului transgenic la un șoc termic. Nivelul expresiei ectopice poate fi reglat prin valoarea temperaturii și prin durata de expunere la șocul termic.

7.3.3 EXPRIMAREA ECTOPICĂ A UNEI GENE DE INTERES CU AJUTORUL SISTEMULUI FLP-FRT

Una dintre cele mai fiabile metode pentru inducerea expresiei ectopice la *D. melanogaster*, exploatează un mecanism de recombinare situs-specifică existent la *S. cerevisiae*. Acest proces este catalizat de către recombinaza FLP, care catalizează excizia unui fragment de ADN aflat între două secvențe FRT (FLP Recombination Targets), orientate în aceeași direcție și care sunt recunoscute de FLP (Wolfner et al., 1994).

Pentru transformare se folosește un construct molecular complex, plasat într-un vector derivat din elementul P, care este injectat în embrioni. Constructul molecular conține un promotor specific și o genă de interes, între care este inserată o “casetă”, flancată de două FRT-uri. “Caseta” este formată dintr-o genă marker și un semnal de terminare a transcripției (semnalul 3’ poli A), care împiedică expresia genei de interes.

Indivizii transgenici obținuți sunt încrucișați cu o linie transformată cu un alt derivat al elementului P, ce conține gena care codifică enzima FLP, plasată sub controlul unui promotor inductibil prin șoc termic. Descendenții acestei încrucișării sunt supuși unui șoc termic scurt, ceea ce determină sinteza FLP, care va exciza secvențele dintre FRT-uri în mod randomic în diferite celule ale embrionului. În aceste celule gena de interes poate fi exprimată, deoarece semnalul de terminare a transcripției nu mai este intercalat între promotor și genă.

Avantajul metodei constă în faptul că, odată activată, gena de interes este exprimată în mod continuu. În plus, deoarece acțiunea FLP este randomică și nu are randament maxim, excizia „casetei” are loc doar în anumite celule, care dau naștere la clone în care se exprimă gena de interes, ceea ce este un mare avantaj pentru studiul modului în care se desfășoară diferențierea celulară. Utilizarea tehnicii FLP-FRT a dat rezultate remarcabile în studiul diferențierii discurilor imaginale la *D. melanogaster*.

7.3.4 EXPRIMAREA ECTOPICĂ A UNEI GENE DE INTERES PRIN UTILIZAREA SISTEMULUI GAL4-UAS

Expresia ectopică poate fi realizată prin utilizarea sistemului GAL4–UAS, care se bazează pe construirea a două elemente inserționale distincte, derivate din elementul P, în care sunt clonate secvențe diferite de ADN de la *S. cerevisiae* (Brand et al., 1994). Într-unul dintre acestea, gena care codifică factorul de transcripție Gal4 este fuzionată cu promotorul transpozazei elementului P, ceea ce permite expresia GAL4 în diferite celule și țesuturi, în funcție de locul inserției în genom. Celălalt construct conține gena de interes, plasată sub controlul secvenței UAS-GAL4 (*upstream activating sequence-GAL4*), astfel încât expresia genică se realizează doar dacă factorul de transcripție Gal4 se leagă de UAS-GAL4. În urma injectării embrionilor cu câte un singur construct, se obțin două categorii de linii transgenice, identificabile cu ajutorul unor markeri genetici, dintre care una exprimă gena GAL4, iar cealaltă conține gena de interes. Această genă nu poate fi însă exprimată, deoarece secvența UAS-GAL4 nu este activată decât de către Gal4. După obținerea celor două tipuri de linii, se face selecția indivizilor care manifestă un model interesant de exprimare a genei GAL4, determinat de locul în care a avut loc inserția, respectiv de enhancerul sub incidența căruia a intrat constructul molecular corespunzător, care funcționează ca *enhancer-trap*. Această selecție se face prin încrucișarea fiecărei linii GAL4 cu o linie care conține inserată gena reporter *lacZ*, aflată sub controlul UAS-GAL4. Liniile descendente care exprimă modele interesante de exprimare a genei GAL4, vor fi folosite pentru realizarea de încrucișări cu liniile care conțin gena de interes aflată sub controlul UAS-GAL4.

Prin această tehnică a fost studiat modul în care acționează genele *even-skipped* și *abd-A*, în diferite etape de dezvoltare ale embrionului de *D. melanogaster*.

CAPITOLUL XXXV

EVOLUȚIA CARIOTIPULUI LA VERTEBRATE

1. INTRODUCERE

Originea vertebratelor începe acum circa 500 milioane de ani din trunchiul cordatelor primitive, în cursul Cambrianului inferior.

Schimbările evolutive de nivel morfologic, fiziologic, biochimic sunt rezultatul selecției naturale care a operat transformări adaptative în cantitatea de ADN. Mecanismele de creștere a cantitații de ADN sunt duplicația genelor, alungirea genelor, formarea de gene hibride, poliploidia, aneuploidia, pseudoaneuploidia și restructurările cromozomale. Mutațiile apărute în genele duplicate au condiționat evoluția divergentă a acestora.

Mărirea cantității de ADN s-a realizat atât prin mărirea numărului de cromozomi, cât și prin alungirea lor – fenomen cunoscut sub numele de *criptopoliploidie.*

Duplicarea repetată a anumitor secvențe de nucleotide din duplexul ADN a dus la apariția de ADN repetitiv. La *Xenopus laevis* circa 45% din genom este reprezentat de ADN repetitiv, pe când la *Bufo viridis,* acesta reprezintă aproximativ 80%. ADN repetitiv reprezintă o povară pentru organism, dar o rezervă, respectiv o sursă nesecată pentru variabilitate în evoluție.

Amplificarea genelor face ca o mică parte din genom (una sau câteva gene) să fie multiplicată într-un număr oarecare de copii, așa cum este cazul genelor ribozomale. Genele ribozomale constituie o familie de gene la care redundanța este foarte mare.

Genele amplificate pot fi translocate de pe un cromozom pe altul, putându-se manifesta diferit în alt context molecular, ceea ce contribuie la mărirea complexității genomului, favorizând evoluția.

Cariotipul reprezintă, în sens larg, caracteristicile numerice și structurale ale complementului cromozomal al celulei, constituind una din proprietățile de bază ale fiecărei specii, organism sau linii celulare stabilizate. Caracteristicile cariotipului sunt strâns legate de funcția codului genetic, iar studiul lor furnizează informații prețioase pentru multe ramuri ale biologiei precum: mutageneza, oncogeneza, virusologia (legat de relația virus-genom celular), citodiferențierea, taxonomia, etc.

Semnificația studiului cariotipului în rezolvarea problemelor taxonomice este destul de clară în cazul mamiferelor.

Principalul avantaj al cariotipului considerat ca un caracter taxonomic, este că structura sa nu se lasă afectată de influențele adaptative directe ale mediului, iar diferențele cariologice pot indica, în mod direct, gradul de izolare reproductivă a formelor comparate.

Anul 1952 a marcat îmbunătățirea metodelor de investigație citogenetică a mamiferelor prin folosirea culturilor de țesuturi, a tratamentului hipoton și a efectelor statmokinetice ale colchicinei.

Începând cu anul 1970, au fost puse bazele citogeneticii moleculare prin introducerea metodelor de colorare diferențiată a cromozomilor (Paris Conference, 1971, 1972; Casperson și Zech, 1973; Nilson, 1972; Orlov și Butanova, 1983, etc.).

Morfologia cariotipului mamiferelor actuale este foarte variată. Numărul diploid de cromozomi variază de la 2n=6 până la 2n=92. Media numărului de cromozomi la mamifere este de 48. Alterările evolutive ale cariotipului care conduc la schimbări ale numerelor diploide de cromozomi și a numărului de brațe sunt produse în special prin fuziuni, fisiuni, inversii pericentrice și modificări în segmentele heterocromatice. Wilson și colaboratori (1975) au estimat că rata evoluției cariotipului mamiferelor este între 1 și 10 schimbări într-o familie, în decurs de 100 de milioane de ani. Maruyama și Imai (1981) au estimat rata a fi mai rapidă, presupunând că există o schimbare a numărului diploid sau a numărului fundamental de brațe cromozomale, în medie, o dată la 2,5 milioane de ani. Rata evoluției cariotipului în diferite grupuri este considerată a fi relativ constantă de către autorii amintiți.

În studiul lui Imai și al colaboratorilor săi (1983), timpul în care are loc o schimbare cariotipică evolutivă este estimat la 2,2 până la 5,5 milioane de ani.

O problemă mult mai discutată este cariotipul ancestral al mamiferelor și tendința de bază care conduce la diferențierea sa. Matthey (1976) consideră că numărul original diploid al cromozomilor de mamifere s-a stabilit la valoarea modală 40–56 de cromozomi. Probabil, diferențierea trebuie să fi avut loc prin intermediul fuziunii și fisiunii, conducând la creșterea și descreșterea, aproximativ egală, a numerelor diploide din diferitele familii. Alți autori consideră că primul mamifer a avut un număr mare de cromozomi uniarmați (2n=80). În evoluție, trebuie să fi avut loc o descreștere globală a numărului de cromozomi ca rezultat al fuziunilor centrice. În același timp, a crescut numărul cromozomilor biarmați, prin acțiunea inversiilor pericentrice.

Todd (1967, 1970, 1975) a susținut un punct de vedere opus prin care presupune că, inițial, cariotipul a avut un număr mic de cromozomi biarmați (2n=6–14) care a crescut ulterior, prin fisiune, în decursul evoluției.

Punctul central al ideii despre mecanismele și cauzele evoluției cariotipului este caracterul dublu al rearanjamentelor cromozomale. Alterarea unui cariotip acționează prin efectele de poziție și numărul grupelor de lincaj asupra expresiei genelor și, în acest fel, asupra proprietăților adaptative fenotipice ale organismului. În același timp, ea are efect asupra proprietăților adaptative fenotipice ale organismului. Acumularea diferențelor cariotipice dintre două forme poate duce la sterilizarea completă a hibrizilor lor și la izolarea reproductivă, care este criteriul de bază în delimitarea și existența speciilor. *Aceasta înseamnă că există o înrudire strânsă între procesele de diferențiere a cariotipului și speciație.*

Metodele cariologice au rezolvat și rezolvă problemele privind starea sistematică a speciilor înrudite sau deosebirile dintre speciile asemănătoare din punct de vedere morfologic. Variabilitatea intraspecifică a cariotipului permite de asemenea, concluzii mai precise în definirea structurii interne a speciilor, ca și a relațiilor dintre diferite populații. O problemă ce urmează a fi rezolvată în acest domeniu este taxonomia și nomenclatura raselor și formelor cromozomale intraspecifice. O singură unitate intraspecifică recunoscută prin nomenclatura internațională zoologică, nu acoperă întreaga distribuție a diferențelor care apar actualmente în natură. Această unitate este subspecia.

În evoluția cariotipului sunt implicați cinci factori:

➨ un mediu celular care să conducă la fragmentarea cromozomală;

➨ în principiu, fragmentarea cromozomală trebuie să apară în poziții nefuncționale;

➨ rearanjamentele cromozomale trebuie să fie compatibile cu rigorile mitozei și meiozei;

➨ rearanjamentele trebuie să furnizeze complexe de gene adaptative;

➨ sistemele de încrucișare să asigure supraviețuirea.

Fragmentarea spontană a cromozomilor a fost evidențiată atât la plante cât și la animale, adesea fiind asociată cu controlul hibridării.

Heterocromatina joacă un rol important în fragmentarea cromozomală. Unele fragmentări pot genera noi rearanjamente care, depășind rigorile meiozei, pot fi ulterior testate de mediu și selectate.

Pentru rearanjamentele cromozomale, orice fragmentare, cu excepția celei de la nivelul centromerului, trebuie să se realizeze la nivelul unei porțiuni nefuncționale a materialului genetic sau, în cazul în care fragmentarea apare la nivelul unui cistron funcțional, o copie funcțională a acelui cistron trebuie să se găsească în genom, aceasta fiind condiția pentru ca rearanjamentul respectiv să supraviețuiască și să se perpetueze, putând să fie menținut în condiție homozigotă.

Succesul fragmentării și al rearanjamentelor cromozomale depinde în mare măsură de prezența secvențelor de ADN repetitiv care constituie un sistem neadaptat, substratul material pentru schimbări ulterioare.

Cariotipurile caracterizate ca fiind „conservative“ își datorează această trăsătură cantității foarte reduse sau chiar absenței heterocromatinei constitutive care este reprezentată, de fapt, de ADN repetitiv. Taxonii care au cariotipuri conservative au foarte puțin ADN repetitiv sau, acesta este prezent într-o cantitate mai mare, el este localizat în aproximativ aceleași poziții în cei mai mulți cromozomi ai complementului, astfel că, interschimburile vor fi nedetectate decât în cazul efectuării unor analize citogenetice și moleculare. Excepție de la această regulă generală sunt cistronii din regiunea organizator nucleolară, care conțin gene pentru ARNr, cistroni constituiți din secvențe de ADN înalt repetate, la cea mai mare parte a organismelor.

Odată rearanjamentele instalate în genom, ele sunt supuse acțiunii factorilor de selecție. La heterozigoții de interschimb, orientarea care permite disjuncția alternativă, în metafaza I, este o precerință pentru supraviețuirea cromozomilor implicați în interschimb, deși disjuncția adiacentă poate conduce la formarea trisomiei și la o creștere monoaneuploidă în numărul de cromozomi. Schimburile structurale care tind să restrângă formarea chiasmelor la porțiunile distale ale brațelor cromozomale, sau orice alți factori care produc chiasme terminale în metafaza I, prezintă un avantaj selectiv la heterozigoții de interschimb. Cromozomii metacentrici cu blocuri considerabile de heterocromatină adiacentă la centromeri sunt astfel, cei mai favorabili pentru evoluția interschimbului, așa cum este cazul la insecta *Periplaneta*.

Succesul translocațiilor reciproce inegale ale tipului de fuziune centrică depinde inițial de formarea chiasmelor și terminalizarea lor în fiecare braț al metacentricului nou astfel că, orientarea metafazică va permite metacentricului nou, să se miște spre un pol al fusului, iar cei doi acrocentrici sau telocentrici spre celălalt pol. Aceleași reguli se aplică pentru heterozigoții prin fisiune centrică.

Fixarea translocațiilor într-o populație poate depinde de mai mulți factori preadaptativi care guvernează orientarea meiotică și care pot fi deopotrivă, de natură genică și de natură structurală. Factorii genetici pot fi legați de distribuția chiasmelor, de terminalizarea chiasmelor, pe când cei de natură structurală implică poziția centromerului și distribuția heterocromatinei. Preadaptarea ideală este legată de cromozomii metacentrici cu blocuri de heterocromatină proximală și rupturi localizate adiacent centromerilor. Selecția ulterioară poate depinde de sistemul de încrucișare.

Populațiile mari, care, în mod normal sunt alogame, își mențin în mare măsură, starea heterozigotă. Reducerea dimensiunii populației sau trecerea de la alogamie la autogamie duce la creșterea homozigotării cu apariția de manifestări letale sau negative ale genelor recesive.

Contracararea acestui efect se poate realiza prin existența polimorfismului de inversie care menține intacte blocuri mari de gene. Același efect îl au translocațiile neomoloage. Fără un efect preadaptativ, prețul translocațiilor poate fi prea mare, prin sterilitatea pe care o determină, mai ales când sunt realizate mai multe interschimburi.

Creșterea numărului de cromozomi a putut avea loc fără o schimbare în conținutul de gene de bază. Astfel de gene, inițial cu grade variate de lincaj, vor avea șansa de a forma homozigoți cu o frecvență mai mare și pot fi produse cu o mai mare rapiditate noi combinații asupra cărora să acționeze selecția. Aceste combinații vor fi realizate prin fisiune centrică și disociere.

Fuziunile centrice determină reducerea numărului de cromozomi, cu pierderea concomitentă a unui centromer și a unei părți din heterocromatină. Când cromozomii fuzionați devin homozigoți, se ajunge la condiția de pseudoaneuploidie, deoarece genele necesare funcționării normale nu sunt pierdute ca în cazul unei aneuploidii adevărate, care implică creșterea și descreșterea numărului de cromozomi din anumite perechi, fiind consecința nondisjuncției cromozomale din meioză.

Evoluția cariotipului, legată de speciație și de apariția unităților taxonomice transpecifice, începe să capete o explicație mai adecvată atunci când datele citologice sunt coroborate cu cele de evoluție moleculară și ecogenetică. Dar, o teorie unitară, bine cristalizată, lipsește în acest domeniu, deși, în ultimii ani, s-au elaborat multe lucrări cu principii generalizatoare (John și Levis, 1966; Stebbinus, 1966; White, 1968, 1969, Lima-de-Faria, 1983).

2. GENOMUL PEȘTILOR

Grupul taxonomic al peștilor este cel mai bogat în taxoni din toată seria vertebratelor. S-au descris 20.000 de specii până în prezent, dintre care 6.000 de apă dulce și 14.000 marine.

Studii citogenetice la pești s-au realizat la circa 1.635 specii din 28 ordine de pești. Numărul modal de cromozomi la pești este de 48 acrocentrici. Numărul diploid de cromozomi variază între 2n=16, la *Sphaerichtys osphoromonoides* (Fam. Belontidae) și ±239 la *Acipenser naccari* (Fam. Acipenseridae).

Numărul diploid 2n=48 s-a identificat la 460 specii, 2n=46 la 225 specii, 2n=50 la circa140 specii. Valorile haploide ale ADN variază între 0,4 picograme la Odontoformes și 142 picograme la Dipnoi.

Cromozomii uniarmați, ca și cei biarmați, au facilitat evoluția numărului și formei cromozomilor. La speciile cu 2n=48 numărul fundamental de brațe cromozomale (NF) este foarte variabil. Apariția microcromozomilor este destul de frecventă la unele specii dintre Cyclostomi, Chondrichthyes, Choanichthyes si Acipenseriformes ca și la amfibienii primitivi. Nediferențierea morfologică a heterozomilor indică originea peștilor dintr-un strămoș comun din stocul anamnian al crossopterigienilor și dipnoilor. După opinia lui Forey (1984), strămoșii tetrapodelor ar fi dipnoii și nu crossopterigienii, dipnoii fiind pești pulmonați care trăiau acum 340 milioane de ani și care sunt apropiați morfo-fiziologic de tetrapode.

Condițiile ecologice ale apelor de munte și lacurile termice, au provocat poliploidia cunoscută la trei specii de *Tor* și câteva specii de apă curgătoare. Poliploidia este frecventă și la ciclostomi Petromyzontiformes. Ostracodermii sunt strămoșii Petromyzontiformelor și Myxintiformelor actuale, realizând legătura cu peștii placodermi și acantoizi. După opinia lui Ohno și colab.(1967), relația diploid-tetraploid, în cadrul familiei Cyprinidae, stă la baza atât a complementului cromozomal, cât și a conținutului de ADN.

Poliploidizarea genomului de bază al vertebratelor s-a produs pe când animalele trăiau încă în apă, constituind un eveniment foarte important în evouția ulterioară a vertebratelor (Ohno și Atkin, 1966).

La Ciprinidae, 2n variază între 44–48 și 50 la majoritatea speciilor raportate.

În cadrul grupului Acheilognatus, 2n variază la 2n=44 la 2n = 48 la *A. rhombea* și *A. tabira tabira.* Această variație a rezultat în urma fuziunii centrice a patru perechi de cromozomi din grupul C (acrocentrici). Se admite că acest fenomen s-a produs la o formă foarte asemănătoare ca *A. lanceolata* actuală, după separarea acesteia de genul *Rhodeus.*

După Ohno și colab. (1967), există o corelație între duplicația la caras, crap și două specii de *Puntius* ca număr de cromozomi și conținut de ADN.

Specia *Cobitis byue* este tetraploidă (2n=96). La alte specii de *Cobitis* 2n=50. La fel, *Misgurnus anguillicaudatus* are 2n=50, pe când *M. fossilis* are 2n=100, fiind tetraploidă. *M. anguillicaudatus* este un paleoendemism pentru Asia de Sud-Est din care a derivat prin poliploidizare *M. fossilis.* Același lucru se constată la *Carassius carassius* (caracuda) cu 2n=50, din care a rezultat o formă tetraploidă 2n=4x=100 din care, prin rearanjamente cromozomale de tip inversii și fuziune centrică, a rezultat specia *Carassius auratus* (peștișorul de aur).

C. auratus (specie tetraploidă) prezintă o plasticitate ecologică deosebit de mare și putere de concurență mare.

Crapul (*Cyprinus carpio*) este o specie tetraploidă veche. Centrul genetic al cyprinidelor este Asia de Sud-Est. Poliploidia mai este întâlnită în cadrul genurilor *Schizothorax*, *Tor* și *Bothya*. La speciile care se reproduc bisexuat, poliploidia este în general letală.

În sisteme industriale de creștere a salmonidelor, poliploidia poate fi provocată prin șocuri reci de temperatură sau prin șocuri de presiune.

Unele specii de *Salmo* (păstrăv) și *Oncorhynchus* (somon) sunt tetraploide. *Salmo gairdneri irideus* (păstrăvul curcubeu) este tetraploid. Evoluția divergetă a genelor duplicate, ca și restructurările cromozomale (inversii pericentrice sau mecanisme robertsoniene de fuziune – fisiune centrică), au dus la comportamentul meiotic diploid la această specie, ceea ce a asigurat fertilitatea și succesul său evolutiv, ca specie tetraploidă. Asemenea mecanism poartă numele de **diploidizare filogenetică a tetraploizilor.**

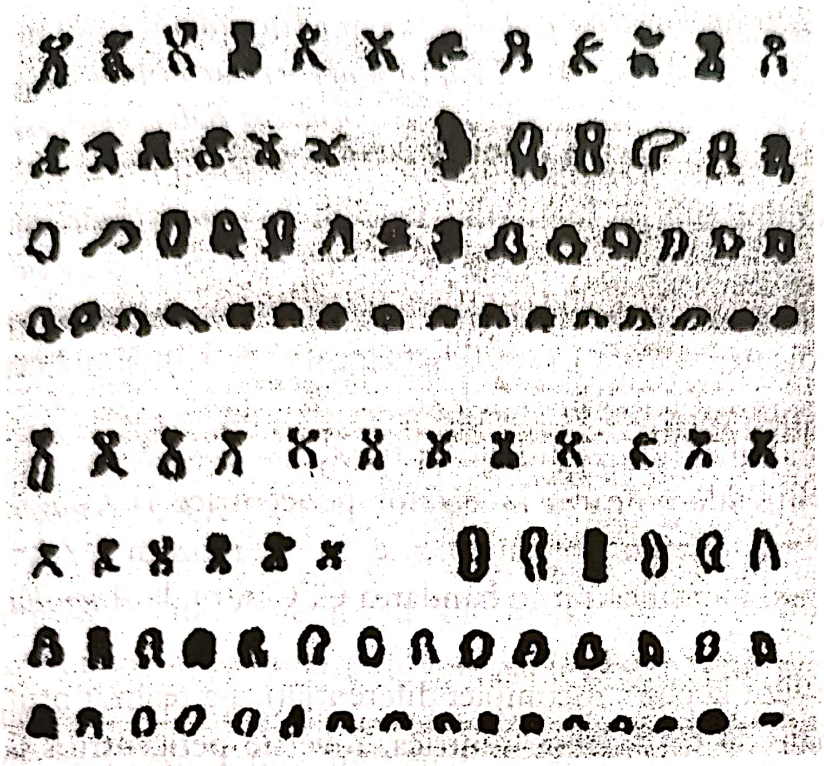
Poliploidia, aneuploidia, pseudoanauploidia și restructurările cromozomale incluzând alungirea cromozomilor (criptopoliploidia) au stat la baza evoluției cariotipului în grupa mare a peștilor.

După Svartson, evoluția salmonidelor europene *Osmerus, Salmo* și *Thymallus* s-a realizat pe calea duplicațiilor intraspecifice repetate ale cromozomilor, pornind de la un număr de bază de x=5 și 2n=10. In grupul ciprinidelor, unele specii au 2n=44 – 48 – 50 de cromozomi (*Acheilognathus tabira tabira* are 44 de cromozomi ca și *A. rhobea, A. lanceolata* are 48 de cromozomi, pe când *Gnathopogon elongatus* are 50 de cromozomi), altele au 100 de cromozomi (*Carasius auratus* și *Cyprinus carpio*), existând și specii cu un număr intermediar de cromozomi (2n=76) și NF=86, precum *Opsariichthys uncirostris*, reprezentând, probabil, un caz de criptopoliploidie.

Dacă la alte grupe de viețuitoare poliploidia a jucat un rol minor de speciație (Mayr, 1969), la pești ea a constituit mecanismul major al speciației, pornind de la cariotipul de bază 2n=48. Grupul cel mai nou de Pisces dintre Osteichtyes (pești osoși), Teleostei, este și cel mai bogat în specii (peste 20.000), el apărând la sfarșitul Cretaciciului și grăbind dispariția reptilelor acvatice din apele continentale, ca și din cele marine.

La *Salmo gairdneri irideus* s-a evidențiat existența unei variații numerice cromozomale între diferite stadii ale dezvoltării ontogenetice, variație care are la bază fuziunile centrice (translocații robertsoniene). O variație asemănătoare a fost evidențiată la somonul atlantic, dar care este urmarea nondisjuncției cromozomale (fig.1).

Polimorfismul cromozomal intrapopulațional remarcat la unele specii (*Spicara*, heringul din Marea Albă, păstrăvul curcubeu, bibanul soare verde,



Ord. Salmoniformes
Fam. Salmonidae

- 18 cromozomi submetacentrici și metacentrici
- 36 cromozomi acrocentrici și subtelocentrici

Există o variație a patternului Robertsonian la somonul de Atlantic, derivat din somonul Nord-american în care, numărul modal de cromozomi variază de la 54 la 56 în diferite râuri.

Fig. 1 — Cariotip *Salmo salar salar* (Somonul de Atlantic), 2n = 54 - 56

crapul african cu dinți) este consecința translocațiilor robertsoniene. La *Carassius auratus* s-a descris o variație cromozomală interpopulațională și chiar intrapopulațională, unele populații, respectiv indivizi, având 100 de cromozomi, pe când altele, 150 de cromozomi. În acest caz, este implicat, cel mai probabil, mecanismul poliploidiei.

La păstrăvul fântânel (*Salvenius fontinalis*) și în cadrul genului *Mystus* din familia Bagridae s-au descris variații numerice generate de aneuploidie.

Sexualitatea peștilor este unică printre vertebrate, ei prezentând unisexualitate, bisexualitate și hermafrodism.

Specia *Serranus scriba* din Marea Neagră prezintă ovare-testis, fiind autofertilă. La *Carrasius auratus gibelio* s-a descris ginogeneza naturală. La formele primitive, sexualitatea este controlată de poligene. Diferențierea heterozomilor s-a relevat prin încrucișări genetice la *Poecilia reticulata*, *Xiphophorus variatus* și *Oryzias latipes*. Din 1400 specii investigate citologic, numai la aproximativ 100 de specii din 48 de familii au fost identificați heterozomii. La mai multe specii s-a identificat determinismul heterogametic al masculilor (XY), printre care la *Argentina silus*, *Mystus gulio*, *Bathylagus* *milleri, Geophagus brasilliensis, Cottus pallax, Carrasius auratus, Scardinius erythrophtalmus, Fundulus diaphanus, Hoplias malabaricus, Mugrunda obscura, Acerina cerna, Perca fluviatilis, Xiphophorus maculatus, Salmo gardneri irideus* etc.

Se întâlnește și determinismul XO la masculi precum la *Lepomis cyanellus, Gobiodan citrinus, Coris julis* etc., precum și de sex mascul heterogametic de tip X_1X_2Y, cum este cazul lui *Cyprinodon* sp., *Germanella pulchra* etc.

Sexul femel heterogametic (ZW) este cel mai comun și întâlnit, de exemplu, la *Gabusia affinis, Conger myriaster* etc.

Se mai descrie sexul femel heterogametic de tip ZO și ZW_1W_2.

Bandarea C a permis identificarea inversiilor pericentrice la *Conger myriaster,* stând la baza diferențelor incipiente în cromozomii ZW. Heterozomii ZW au fost identificați prin bandarea C, G si Q, la *Anguilla anguilla* și *A.rostrata.*

Evoluția heterozomilor la pești, incomplet diferențiați, s-a realizat prin remanieri cromozomale de tip fuziune centrica, inversie pericentrică și nondisjuncție în meioză.

Se consideră că toate speciile unisexuate de pești, ca și de alte vertebrate, (amfibieni, șopârle) sunt la origine specii hibride. Prin hibridare, apar modificări în desfășurarea meiozei, care duc la apariția de ovule nereduse (diploide) ce se pot dezvolta ginogenetic.

Hibridogeneza determină includerea în ou doar a genomului matern de *Poeciliopsis monach,* cel patern derivat de la *P. lucida* fiind eliminat și înlocuit în fiecare generație. Aberațiile meiotice pot să se autoperpetueze luând naștere specii hibride care pot fi diploide, tetraploide și mai rar, triploide (*Carassius auratus gibelio).*

Speciile poliploide pot rezulta direct din acțiunea factorilor de mediu în gametogeneză, asupra gameților deja formați, ca și în urma hibridării ce poate modifica meioza.

Poliploidia a fost factorul major al evoluției cariotipului la pești, generând specii care ulterior s-au diversificat prin mecanismele robertsoniene ale pseudoaneuploidiei și, mai mult, a avut loc regruparea genelor pre-existente în noi grupări genice, prin remanieri cromozomale precum delețiile, duplicațiile, inversiile, translocațiile. Modificările cantitative și calitative au condus la conturarea de funcții noi, prin mecanismul duplicației genice (Ohno, 1970). Divergența secvențelor din ADN și remanierile cromozomale au făcut ca un organism inițial tetraploid, să-și restabilească starea diploidă a genomului, regularizându-și meioza și fertilitatea prin diploidizarea secundară a tetraploizilor.

Determinarea complexității cineticii de renaturare a ADN repetitiv și nonrepetitiv este cea mai relevantă metodă care permite restabilirea drumului filogenetic parcurs de specie, adică vârsta din momentul poliploidizării și până în momentul actual. Metoda se bazează pe analiza divergenței trăsăturilor genelor duplicate (Straus, 1971; Zimmermann și Goldberg, 1977).

Pe baza analizei la nivel molecular (cinetica renaturării) s-a stabilit că *Cyprinus carpio* are o istorie de 60 milioane de ani, de la apariția poliploidizării, ceea ce corespunde cu datele paleontologiei, la fel genul *Thymallus*, pe când genul *Coregonus* are 20 milioane de ani, iar genul *Salmo* numai 2,5 milioane de ani (Obruchev, 1967). Estimarea a 3 milioane de ani de evoluție după poliploidizare, perioadă în care s-au format autotetraploizi foarte recenți (*Salvelinus fontinalis, Salmo gairdneri* și *Coregonus lavaretus*) este compatibilă cu datele analizelor de cinetica renaturării ADN.

Poliploidizarea a mărit posibilitățile de adaptare la noi condiții de viață. La unele specii, cantitatea de ADN este de 20% din aceea a mamiferelor, pe când la altele este de 35 de ori mai mare. Speciile mai evoluate și mai specializate, mai adaptate unei anumite nișe ecologice, au o cantitate mai mică de ADN, exact indispensabilă în condițiile specifice ale nișei la care s-au adaptat. Orice grup bogat în specii va produce în timp scurt astfel de specii, dar ele sunt închise în evoluție, fiind prea specializate. Acestea nu vor mai da naștere la alte specii urmași, astfel că, atunci când se schimbă condițiile de mediu, ele dispar. Singura lor șansă, pentru evoluția ulterioară, este poliploidia, dacă ea se produce.

Diversitatea extraordinară de forme a peștilor este impresionantă, de la sturionii globoizi, la forma de ac de la Sygnathiformes sau de pipă, la peștele pipă, sau de la o greutate de 0,5 g pe care o are *Pandaka pygmaea* din Insulele Filipine, la 50 tone la rechinul balenă (*Rhyncodon typicus*). Speciile de pești au valorificat la maximum nișele ecologice la care s-au adaptat remarcabil – pești zburători marini (*Exocoetidae*) sau de apă dulce din Africa (*Pantodontidae*) sau pești marini de sub banchiza antartică (*Nothotenioidei*), adaptați la cele mai vitrege condiții de viață ale planetei, producând compuși antigel cu puternice proprietăți antifrig, plutind neutru în masa apei prin

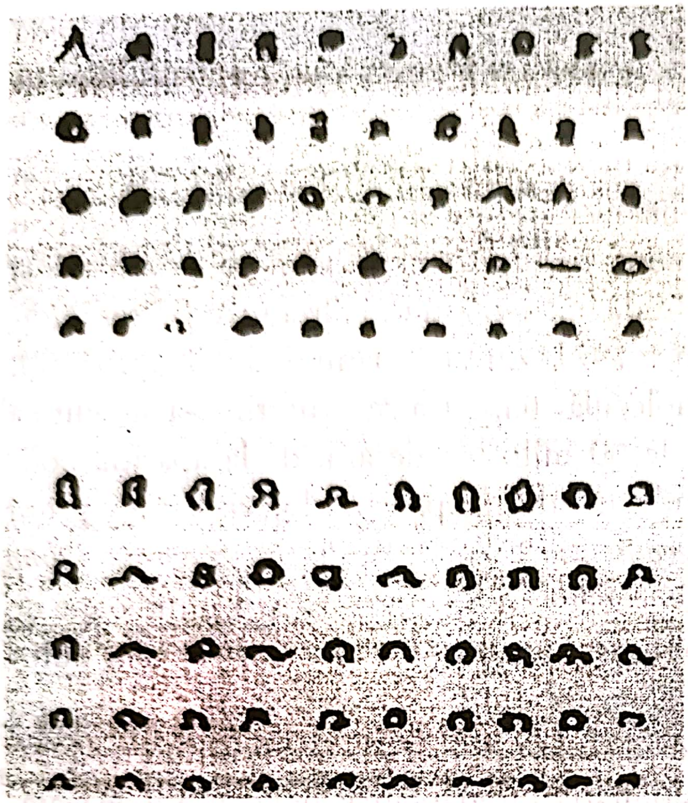


Fig. 2 — *Esox niger*; 2n = 50; Ord. Salmoniformes, Fam. Esocidae Cariotipul acestei specii cuprinde cromozomii acrocentrici și subtelocentrici, uniarmați. Cromozomii prezintă o creștere gradată în dimensiuni, fap care face imposibilă gruparea acestora după mărime. Nu este evidențiat un dimorfism sexual cromozomal.

dezvoltarea enormă a sacilor lipidici intermusculari, reducerea scheletului ca la păsări, persistența notocordului la adult.

În fluidele corpului la peștii din subordinul *Nothotenioidei* se află 8 molecule de glicopeptide antifrig cu GM de 2600 – 33700 Da, iar rinichii lor sunt aglomerări celulare ce permit reabsorbția zaharurilor și a polipeptidelor scindate.

3. GENOMUL AMFIBIENILOR

Amfibienii prezintă o poziție filogenetică tranzitorie, fiind caracterizați de cariotipuri bimodale și primitive, prezența de microcomozomi la formele primitive și număr diploid, mic de cromozomi la formele evoluate. În ovocitele lor se află cromozomi lampbrush. Heterozomii sunt slabi diferențiați morfologic. Studiați mai întâi în celulele testiculare, cromozomii amfibienilor au fost ulterior studiați în celulele din splină, la ambele sexe.

Amfibienii reprezintă cel mai restrâns grup de specii deși, în trecut, au fost foarte diversificați, fiind primii cuceritori ai uscatului, acum circa 400 – 500 milioane de ani, inaugurând apariția supraclasei Tetrapoda, asociată cu modificări anatomo-fiziologice profunde.

Actualmente, sunt identificate 2500 de specii de amfibieni care își au originea în grupul peștilor dipnoi (Forey, 1984). Cei mai vechi amfibieni au fost stegocefali de tipul Ichtiostegidelor din Devonian. Ei au evoluat dând linii distincte, ce au culminat cu ordinul Anthracosauria din Carboniferul Superior care stau la originea reptilelor. Talia stegocefalilor, varia între câtiva centimetri și 3–5 m lungime la *Mastodonsaurus giganteus.* Ca și reptilele, batracienii (amfibienii) au mai mult trecut decât prezent.

Evoluția genomului în cadrul acestui grup a fost mai puțin dinamică decât a peștilor, dând trei ordine diferite: Apoda (*Gimnophiona*), Urodela și Salientia (*Anura*). În cadrul ordinului Apoda se întâlnesc cariotipuri bimodale și simetrice. Speciile cele mai primitive au un cariotip bimodal tipic, constând în micro și macrocromozomi, pe când, la formele avansate apar cariotipuri simetrice cu cromozomi biarmați, fiind foarte rari cromozomii telocentrici și acrocentrici.

Simetrizarea progresivă a cariotipului realizată prin eliminarea microcromozomilor și, ca o consecință, pierderea naturii sale bimodale a constituit direcția evolutivă majoră la ordinul Apoda. Prin aceasta s-a realizat o reducere a numărului diploid de cromozomi în familiile avansate sau derivate din strămoșii mai vechi. Sunt însă, și unele excepții: astfel, *Uraetyphlus narayanii* are 2n=36, pe când, forma derivată *Gymnophis sphraphiniare* are 2n=38 cromozomi. Unele specii de apode prezintă asemănare cu unele specii de anure. La Urodele se constată o omogenitate a setului diploid normal la diferitele familii. Cariotipuri bimodale au fost întâlnite la familiile Hynobidae și Cryptobranchidae, iar cariotipuri simetrice la familiile Syrenidae, Ambystomatidae, Plethodontidae, Amphiuridae, Proteidae și Salamandridae.

Complementul diploid variază de la 2n=22 și 2n=24, la familia Salamandridae, la 2n=28, la familia Ambystomatidae, Plethodontidae și Amphiuridae; la 2n=38, la Proteidae; 2n=46, 52, 64, la Sirenidae; 2n=60, la Cryptobranchidae și 2n=56–66, la Hynobidae.

În cadrul ordinului Anura apar și cazuri de aneuploidie intraindividuală (în diferite țesuturi) la *Bufo stomaticus.*

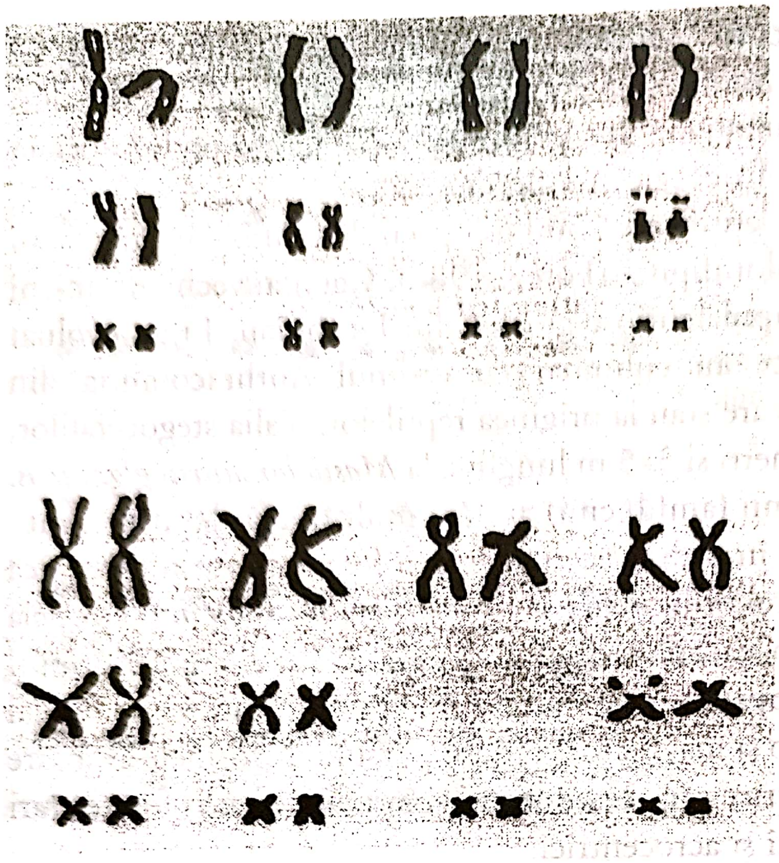


Fig. 3 — *Bufo marimus* (Linnaeus) 2n=22
Ord.Anura
Fam. Bufonidae
Autozomi: – 8 metacentrici și submetacentrici mari
– 4 metacentrici și submetacentrici de dimensiune medie
– 2 cromozomi submetacentrici mici
– 8 metacentrici mici
Heterozomi: nu sunt diferențiați
Cea mai mică pereche de autozomi submetacentrici prezintă o constricție secundară proeminentă pe brațul scurt.

La baza evoluției Anurelor a stat un numar modal de cromozomi de 2n=26 cromozomi. La cele mai multe specii cromozomii biarmați sunt metacentrici și submetacentrici. În familia Bufonidae s-au identificat complemente cromozomale cu 2n=20 și 22 cromozomi. Trecerea de la 20 la 22 de cromozomi s-a realizat prin pierdere sau translocare de cromozomi mici.

În familia Microhylidae apar garnituri de cromozomi de 22, 24, 26 și 28 cromozomi. Numărul modal 2n=26 a fost întâlnit și la familia Ranidae, aceasta având un cariotip simetric cu cromozomi biarmați, 5 perechi mari și 8 perechi mai mici.

Poliploidia a jucat un rol important în evoluția unor familii de amfibieni. Serii poliploide cu specii triploide și octoploide au fost descrise la 5 specii bisexuate din cadrul familiei Ceratophrydidae și Hylidae.

La Urodele s-au identificat unii indivizi triploizi. Asemenea triploizi se obțin și experimental prezentând o fertilitate redusă. Prin partenogeneză au apărut populații triploide la axolotl (*Ambystoma mexicanum, A. tigrinum*). La *Odontophrynus americanus* (specie tetraploidă 2n=2x=24) s-a descoperit o populație paleoendemică diploidă 2n=2x=22 care este identică cu forma tetraploidă. Este cert că populațiile diploide naturale pot da naștere la forme tetraploide.

În urma hibridării, ca și în cazul peștilor, se pot produce ouă nereduse, așa cum s-a înregistrat în cazul încrucișării *Xenopus laevis* x *X. gili,* din care se obțin femele ce produc ouă haploide și diploide.

În cadrul ordinului Anura, evoluția cariotipului s-a realizat prin rearanjamente structurale aneuploide.

La genuri diferite, precum *Odonthophrynus, Strombus* și *Macrogenioglotus* apare o remarcabilă similitudine a cariotipurilor, micile diferențe fiind

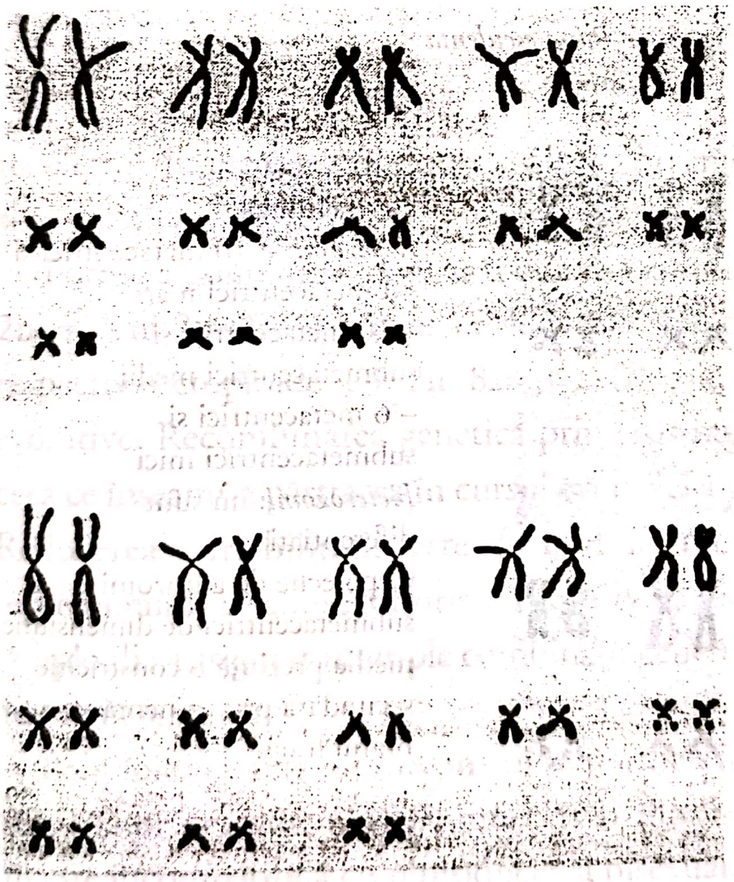
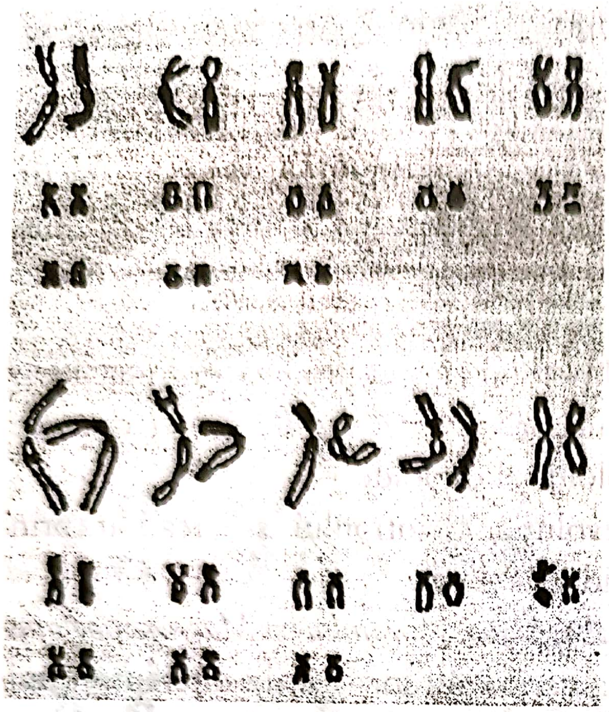
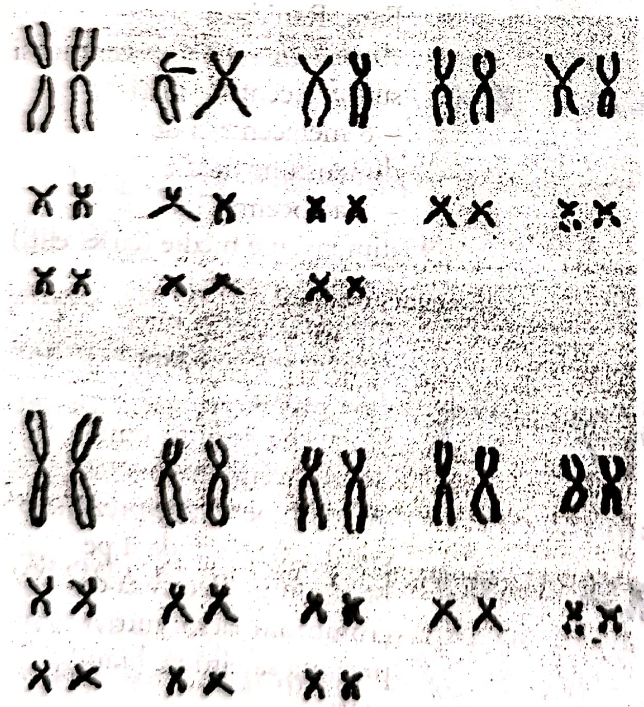


Fig. 4 — *Rana clamitans*
2n=26
Ord. Anura
Fam. Ranidae
Autozomi: – 10 metacentrici și submetacentrici mari
– 8 metacentrici de dimensiune medie
– 2 acrocentrici de dimensiune medie (cu sateliți)
– 6 metacentrici și submetacentrici mici
Heterozomi: nu sunt diferențiați
Opereche de autozomi submetacentrici de dimensiune medie prezintă o constricție secundară pe brațul lung. Perechea de cromozomi acrocentrici prezintă sateliți pe brațul scurt.



Ord. Anura
Fam. Ranidae
Autozomi: – 10 metacentrici și submetacentrici mari
– 6 metacentrici și submetacentrici de dimensiune medie
– 4 subtelocentrici medii
– 6 metacentrici și submetacentrici mici
Heterozomii: nu sunt diferențiați
O pereche de autozomi submetacentrici de dimensiune medie prezintă o constricție secundară proeminentă pe brațul lung.

Fig. 5 — *Rana esculenta*
2n=26



Ord. Anura
Fam. Ranidae
Autozomi: – 10 metacentrici și submetacentrici mari
– 10 metacentrici și submetacentrici medii
– 6 metacentrici și submetacentrici mici
Heterozomi: nu sunt diferențiați
O pereche de autozomi submetacentrici de dimensiune medie prezintă o constricițe secundară proeminentă pe brațul lung.

Fig. 6 — *Rana pipiens pipiens*
2n=26

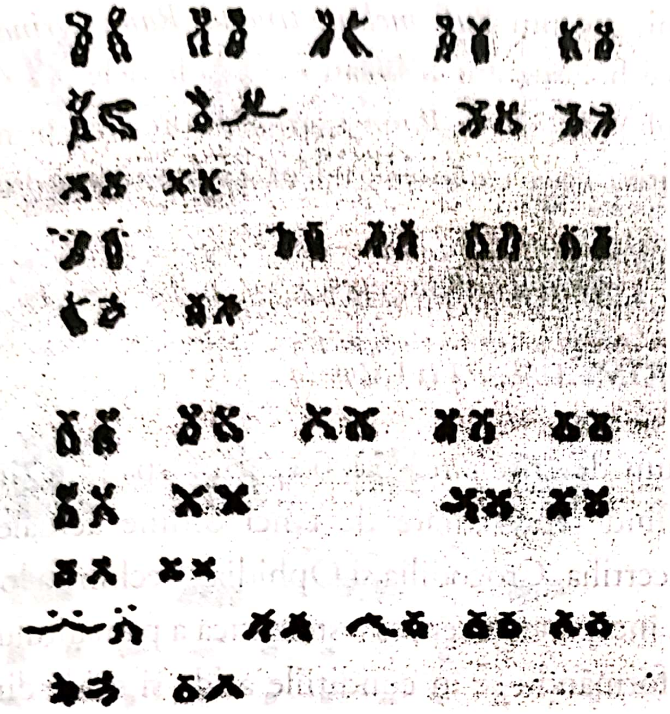


Fig. 7 — *Xenopus laevis*
2n=36
Ord. Anura
Fam. Pipidae
Autozomi: – 14 metacentrici și submetacentrici mari
– 4 submetacentrici de dimensiune medie
– 2 acrocentrici mari (cu sateliți)
– 12 subtelocentrici mari
Heterozomi: nu sunt diferențiați
O pereche de cromozomi acrocentrici prezintă constricție secundară și sateliți pe brațul scurt.

rezultatul duplicației genelor și evoluției divergente a genelor duplicate, ca și al deleţiilor, inversiilor și translocaţiilor.

Formele poliploide, cum ar fi cele din familia Ceratophrididae (2n=22; 2n=44 sau 2n=26) din care au derivat forme decaploide 2n=10x = 110 , respectiv octoploide cu 2n=8x=104 (Beçak, 1970), prezintă avantaje evolutive. Recombinarea genetică prin crossing-over la anure este redusă, ceea ce înseamnă păstrarea în cursul evoluției a grupurilor vechi de linkage. Reducerea variabilității este favorabilă menținerii speciei în areal, reprezentând un conservatorism evolutiv ce asigură continuitatea speciei. Poliploidia a asigurat multiple combinații genetice, oferind selecției material de prelucrare.

Poliploidia a fost un mecanism major de evoluție la amfibieni, la care, asemănător peștilor, nu s-au diferențiat morfologic heterozomii și astfel, nu este incompatibilă cu reproducerea bisexuată. Poliploidia vertebratelor superioare, la care heterozomii sunt bine diferențiați, produce anomalii intersexuale și sterilitate.

La unele specii de amfibieni, precum *Bufo melanostinetus, Rana tigrina* și *R. cyanoflictus* s-au descoperit heterozomi XY (sau ZW) la femele și XX (ZZ) la masculi. Cromozomul Y(W) de la *Rana tigrina* se prezintă prin bandare C în întregime pozitiv, ceea ce înseamnă că este alcătuit din heterocromatină constitutivă.

4. GENOMUL REPTILIAN

Reptile. În clasa Reptilia sunt descrise circa 6000 specii răspandite, în special, în regiunile calde, fiind reprezentate de cinci ordine actuale: Chelonia, Rinchocephalia, Lacertilia, Crocodilia și Ophidia. Vechimea lor este 350–360 milioane de ani, începând cucerirea sistematică a pământului la începutul Carboniferului, formându-se în condițiile aride și calde din timpul secetei, urmată de glaciațiunea permienă.

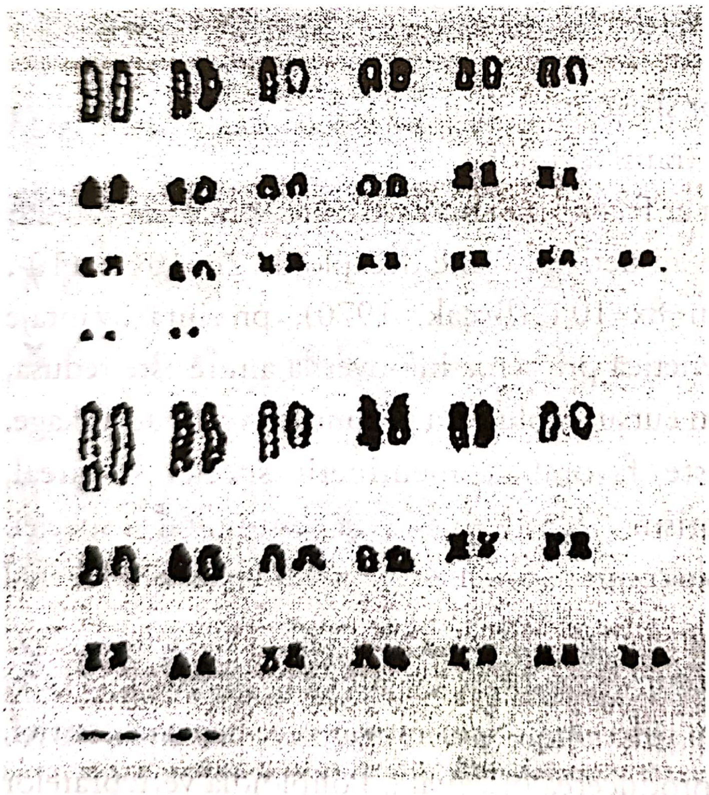


Fig. 8 — Cariotipul la
Caiman crocodilus
2n=42
Ord. Crocodilia
Subord. Eusuchia
Fam. Crocodylidae
Macrocromozomi
– 16 metacentrici și submetacentrici
– 22 acrocentrici
Microcromozomi – 4

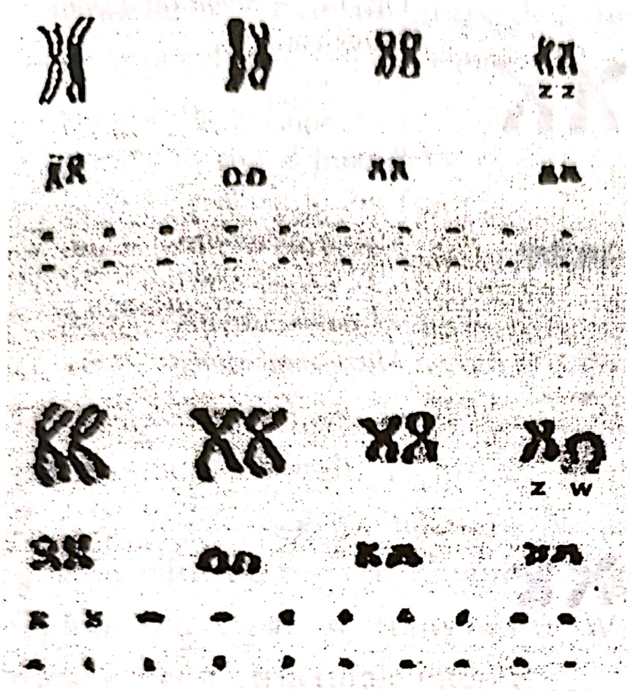


Fig. 9 — *Philodryas olfersii olfersii*
(Cobra verde)
2n=36
Ord. Squamata
Subord. Serpentes
Fam. Columbridae
Macrocromozomi:
Autozomi – 12 metacentrici și submetacentrici
Heterozomi – Z metacentric
– W acrocentric
Microcromozomi: – 20

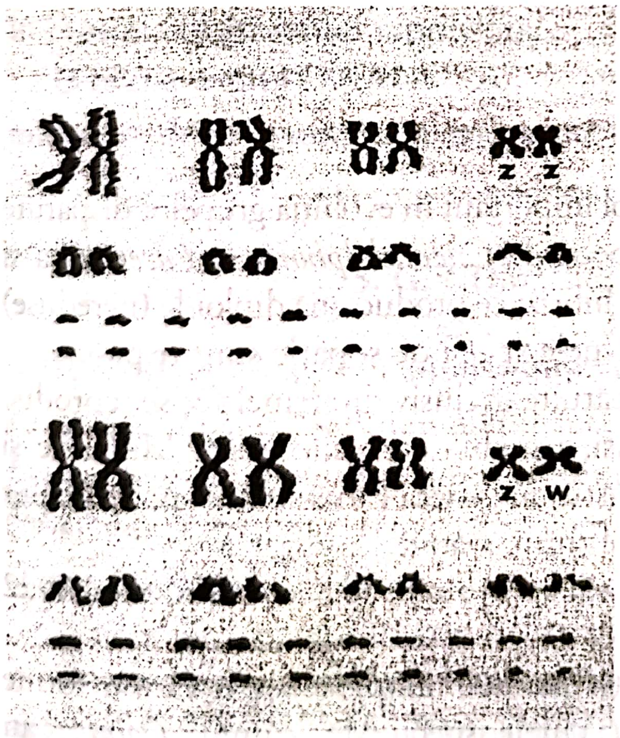


Fig. 10 — *Eunectes murinus*
(Anaconda)
2n=36
Ord. Squamata
Subord. Serpentes
Fam. Boidae
Macrocromozomi:
– 8 metacentrici și submetacentrici
– 8 acrocentrici
Microcromozomi: – 20

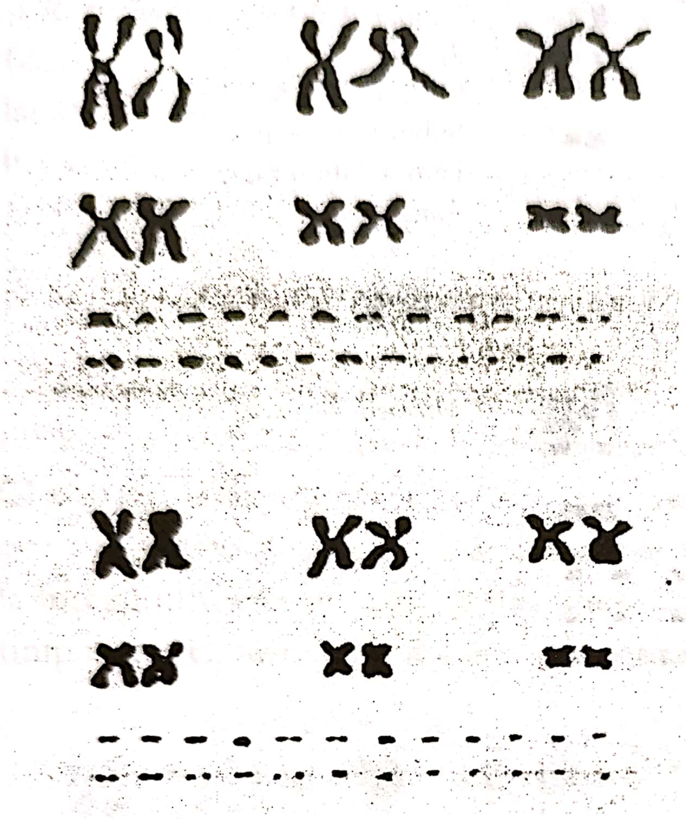


Fig. 11 — *Anolis carolilensis*
(cameleon)
2n = 36
Ord. Squamata
Subord. Sauria
Fam. Iguanidae
Macrocromozomi:
– 12 metacentrici și
submetacentrici
Microcromozomi: – 24

Poliploidia ar fi putut juca un rol important în evoluția grupelor dispărute de reptile. Prin hibridare între specii de *Cnemidolphorus* și *Lacerta,* ca și între alte genuri de șopârle, rezultă hibrizi ce produc ouă diploide (nereduse) care se dezvoltă partenogenetic. Unele specii de șoparle sunt triploide.

La crocodili există populații alcătuite exclusiv din femele ce se reproduc partenogenetic, prezentând, totuși, variabilitate genotipică. Mutațiile și restructurările cromozomale constituie sursa variabilității poliploizilor rezultați prin hibridare, care, între timp, s-au diploidizat.

Cromozomii sexelor la *Ophidieni* (șerpi) au fost descoperiți în anul 1922 de către Kobell.

La familiile evoluate de șerpi (Viperidae, Elapidae) apar variate forme de diferențiere a heterozomilor. Unele specii ale genului *Coluber* au heterozomi heteromorfi.

Spre deosebire de alte grupe de animale, cromozomii sexelor la reptile reprezintă cel mai variabil element al genomului (BeçaK și BeçaK, 1969; Baker și Singh, 1972).

Cromozomul Z prezintă un mic bloc de heterocromatină centromerică, precum și un bloc „gri" pe ambele telomere. Cromozomul W la unele specii este acrocentric, iar la altele, acesta este metacentric sau submetacentric.

La specia *Bungarus coeruleus,* din India, apar numere diploide variabile (2n=43, 44, 45), la femele și un număr constant (2n=44), la masculi. Formula cromozomilor de sex poate fi $Z_1Z_1Z_2Z_2$, pentru mascul, și Z_1Z_2W, pentru femela (Singh, 1970). La unele femele poate apare și formula $Z_1Z_2W_1W_2$. Întreg cromozomul W este C-pozitiv, având ADN satelit specific distribuit de-a lungul întregii lungimi și conservat la toți Ophidienii. Apar și translocații W – microautozomi, urmate de rearanjamente structurale interne.

Toate reptilele conțin număr mare de microcromozomi greu identificabili.

Mecanismele robertsoniene de fuziune-fisiune centrică au fost operante în evoluția cariotipului reptilelor.

Evoluția complementului cromozomal la reptile cunoaște o diversitate mai mare decât la amfibieni în cadrul aceluiași grup.

5. GENOMUL PĂSĂRILOR

Păsările (*Aves*) au fost supranumite de evoluționiști *„reptile glorioase*". În clasa *Aves* sunt încadrate 8.700 specii încadrate în numeroase ordine. Ele au aparut la mijlocul mezozoicului, dintr-un grup de reptile numit *Pseudosuchia*, pe o linie filogenetică comună cu a ordinului *Squamata* (serpi și șopârle) și a crocodililor.

Păsările au realizat un grup foarte numeros și omogen.

Dimensiunile genomului variază foarte puțin, în cadrul speciilor ce aparțin la ordine diferite, comparativ cu peștii, amfibienii și mamiferele. Genomul păsărilor seamănă cu cel al reptilelor, cu care se și înrudesc.

Cantitatea haploidă de ADN per celulă variază la păsări între 1,7 și 2,3 pg.

Cromozomii păsărilor, ca și cei de la reptile reprezintă o foarte mare variație dimensională fiind clasificați în microcromozomi și macrocromozomi. Studii cariotipice s-au efectuat la circa 320 specii de păsări.

Existența unui număr mare de minicromozomi se leagă probabil de cronservarea unor grupe ancestrale de linkage, la nivelul minicromozomilor, neavând loc crossing-over.

Cu exceptia ordinului Falconiformes, numărul diploid de cromozomi la păsări variază între 40, la pasărea ogorului (*Eurchinus oedicnemus*) și 126 la pupăză (*Upupa epops*). Circa 80,61% dintre specii prezintă un număr diploid de cromozomi de 78–82.

Cariotipul standard la păsări conține un număr diploid de 80 cromozomi.

Când numărul macrocromozomilor crește, scade corespunzător numărul de microcromozomi, existând o conexiune evolutivă și de reglaj genetic între cele două tipuri de cromozomi. Cariotipul standard cu 16 macrocromozomi și 64 microcromozomi a fost înalt conservat în cursul evoluției păsărilor. La ordinele *Charadriiformes* și *Cicoriformes* există tendința clară de reducere a numărului de microcromozomi.

Cromozomii sunt, în general, subtelocentrici și telocentrici, mai rar metacentrici și submetacentrici. Translocațiile implică la păsări fuziune de macrocromozomi de talie mică și fuziune microcromozomi- macrocromozomi, schimbând poziția centromerului de la telocentric la subtelocentric sau submetacentric (Ansari și Kaul, 1979).

Diferența cariotipică dintre porumbel (*Columba livia*) și gugustiuc (*Streptopelia risaria*) constă în fuziunea a patru perechi de microcromozomi la gugustiuc. (fig. 12, 13)

Fuziunea cromozomală este un mecanism important de evoluție în cadrul grupului mare al păsărilor. Falconiformele sunt foarte evoluate morfologic și cariotipic, la familia Aecipitridae, constatându-se o reducere extremă a numărului de microcromozomi și totodată scăderea numărului de macrocromozomi telocentrici, crescând numărul celorlalte tipuri de macrocromozomi.

Caracteristic pentru păsări este faptul că, diferențele mici în dimensiunea genomului stau la baza unei variabilități genetice foarte mari, constituind mai mult decât la alte grupe de vertebrate, o premisă a speciației.

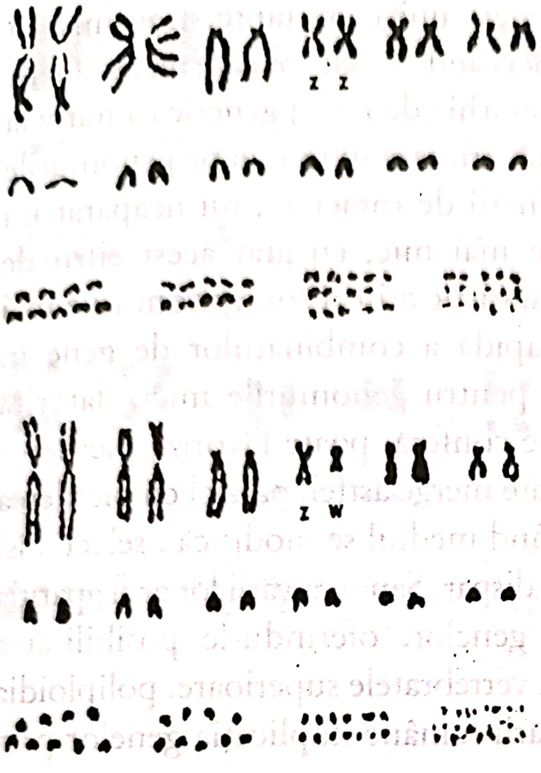


Fig. 12 — *Columba livia domestica*
2n = 80

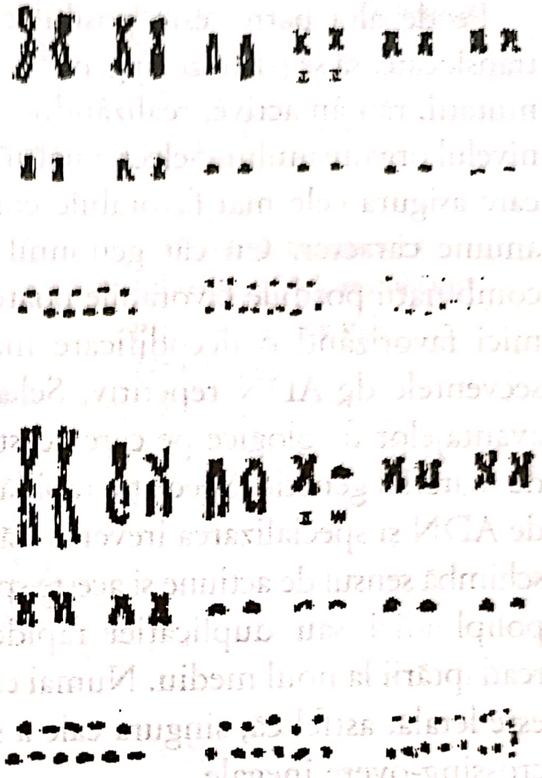


Fig. 13 — *Streptopelia risaria*
2n = 68

Cantitatea de ADN satelit înalt repetitiv, este variabilă de la o specie la alta și este apreciabilă în genomul Galiformelor, reprezentand 25% din ADN total.

Ca și la plante, grupele de animale cu genomuri progresiv descrescânde au avut și au o speciație extensivă, cuprinzând un număr mare de specii pe când grupele cu puțini reprezentanți actuali au o dimensiune mai mare a genomului. Genomurile prezintă o redundanță mare, asociată cu o inerție genetică, de asemenea apreciabilă. Mutațiile care apar în asemenea genomuri, dacă sunt într-o singură copie nu fac obiectul câmpului de acțiune al selecției chiar și atunci când genele sunt funcționale. Atunci când mutațiile se răspandesc în mai multe copii, la nivelul ADN repetitiv netranscris, ele se pot acumula în număr mare, dar nu au o expresie fenotipică și deci, nu cad în incidența actiunii selecției naturale.

Pe de altă parte, este posibil ca genele unice mutante, transmise și translocate, să se păstreze în genom, atunci când, alelele lor care nu au suferit mutații, rămân active, realizându-se o ierarhie de reglaj genetic calitativ la nivelul organismului. Selecția naturală favorizează în populație genomurile care asigură cele mai favorabile combinații de caractere, nu neapărat un anume caracter. Cu cât genomul este mai mic, cu atât acest cifru de combinații posibile favorabile poate fi statistic atins ușor, genomurile mai mici favorizând o decodificare mai rapidă a combinațiilor de gene în secventele de ADN repetitiv. Selecția pentru genomurile mici, datorită avantajelor fiziologice pe care acestea le conferă, poate favoriza pierderea de material genetic. Speciația rapidă poate merge astfel, paralel cu pierderea de ADN și specializarea ireversibilă. Când mediul se modifică , selecția își schimbă sensul de acțiune și aceste specii dispar. Șansa salvării lor ar fi apariția poliploidiei sau duplicației rapide a genelor, oferindu-le posibilitatea readaptării la noul mediu. Numai că, la vertebratele superioare, poliploidia este letală, astfel că, singura cale a salvării rămâne duplicația genelor prin crossing-overe inegale.

Pentru evoluția vertebratelor, Goin și Goin (1968), au elaborat un model al grupelor ancestrale cu o cantitate moderat ridicată de ADN, conducând la grupe avansate, cu multe specii specializate, având o cantitate mai mică de ADN.

Păsările constituie probabil clasa de vertebrate cea mai specializată din punct de vedere morfologic, fiziologic și biochimic, ocupând, prin numărul de specii, locul doi după peștii osoși teleosteeni, numărul lor putând fi chiar mai mare dacă posibilitatea de locomoție prin zbor, depășind ușor barierele geografice, nu ar fi redus amploarea mecanismului de izolare geografică.

Rezultă că speciația la păsări este consecința existenței unui genom mic.

După Takagi, (1972) *Ratitele* nu au heterozomi diferențiați morfologic. Dar, celelalte grupe de păsări prezintă un heteromorfism clar al heterozomilor, care sunt desemnați ZW, la femelă și ZZ, la mascul.

Bandarea C a permis descrierea modului de heterocromatinizare și eucromatinizare a cromozomilor W, la specii de papagali amazonieni (*Hispaniola paroth, Amazona ventralis* și *A. vittatus*) prezentând banda C centromerică și două regiuni gri, una telomerică gri pe brațul scurt și alta situată la 2/3 din telomer, pe brațul lung. Aceeași diferențiere liniară apare și la șoimul cu coadă roșie (*Buteo jamaicensis*), deși aparține altui ordin.

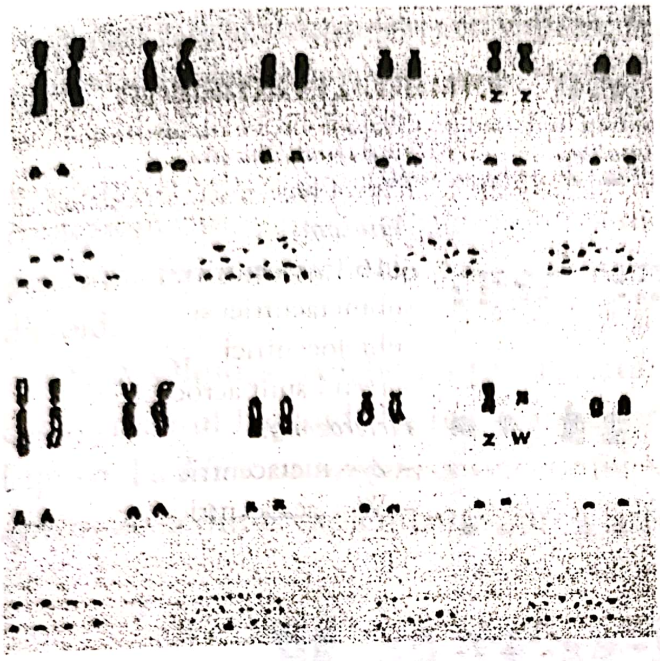


Fig. 14 — *Galus domesticus*
(Găina domestică)
2n = 78
Ord. Galliformes
Fam. Phasianidae
Autozomi:
– 10 submetacentrici și subtelocentrici, restul sunt probabil acrocentrici
Heterozomi:
– Z – metacentric
– W – submetacentric

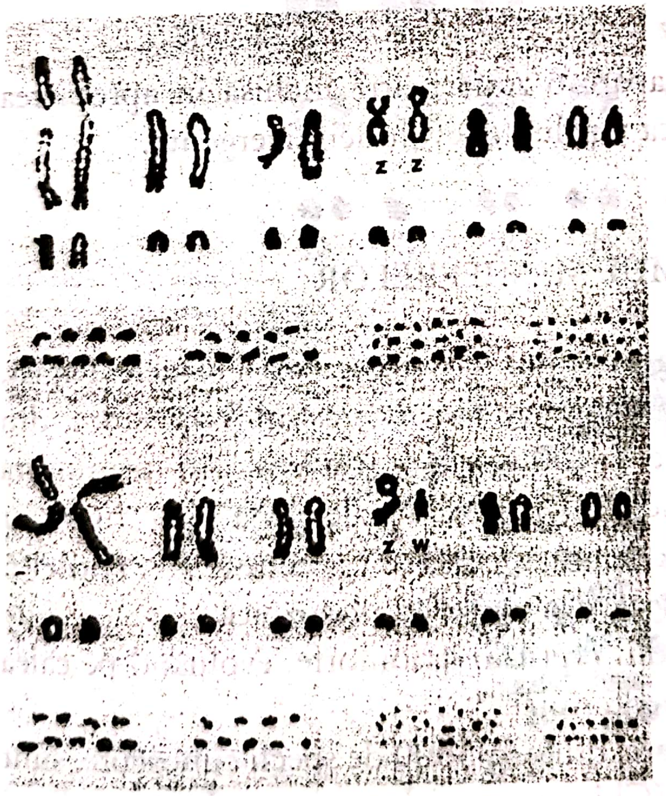


Fig. 15. *Phasianus colchicus*
2n = 82
Ord. Galliformes
Fem. Phasianidae
Autozomi:
– 2 submetacentrici, restul sunt probabil acrocentrici
Heterozomi:
– Z – submetacentric
– W – subtelocentric

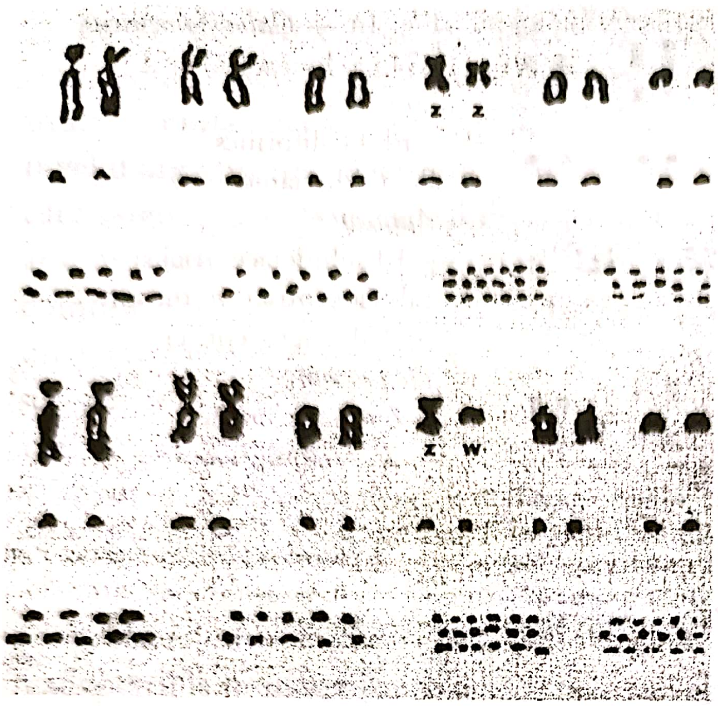


Fig. 16 — *Coturnix coturnix japonica* (prepelița japoneză)
2n = 78
Ord. Galliformes
Fam. Phasianidae
Autozomi
– 16 metacentrici, submetaentrici și subtelocentrici
– restul sunt acrocentrici
Heterozomi:
– Z – metacentric
– W – acrocentric

La șoim însă, pe brațul lung apare o zonă foarte închisă în apropierea centromerului și telomerului, ca rezultat al evoluției divergente.

6. GENOMUL MAMIFERELOR

Mamiferele sunt viețuitoare care domină biosfera actuală a planetei Pământ, apărând acum circa 200–240 milioane de ani, la sfâșitul Triasicului, din grupul de mamifere primitive tricodonte, au traversat în penumbră mezozoicul (Jurasicul și Cretacicul), perioada paleogenă . Evoluția lor explozivă în neozoic trebuie pusă pe seama declinului reptilelor atotstăpânitoare în apă și pe uscat, din perioada mezozoică.

Mamiferele îi trag originea din reptilele teriomorfe, evoluând pe calea homeostaziei genetice și a homeotermiei.

Cele mai numeroase mamifere, din cele 5000 de specii cunoscute, sunt rozătoarele (Rodentia), liliecii (Chiroptera) și Insectivora. În Australia și America de Sud se mai păstrează mamifere primitive din grupul Marsupialia și Monotreme (echidna și ornotorincul), care supraviețuiesc ca veritabile fosile vii, izolate geografic de restul continentelor, unde domină placentarele (eutherienele).

Formula de bază a heterozomilor la mamifere este XX, pentru femelă și XY, pentru mascul. Cromozomul X este, cu câteva excepții,cel mai mare cromozom din complementul cromozomal diploid. Cromozomul Y este prezent la toate mamiferele și este cel mai mic element al complementului diploid.

După Ohno și colaboratorii săi, cromozomul X reprezintă 5% din complementul haploid. La rozătoare el prezintă 10% din complementul haploid. La *Microtus oregoni* cromozomul X reprezintă 15%, iar la *Microtus agrestis* 20% din complementul haploid. (fig17)

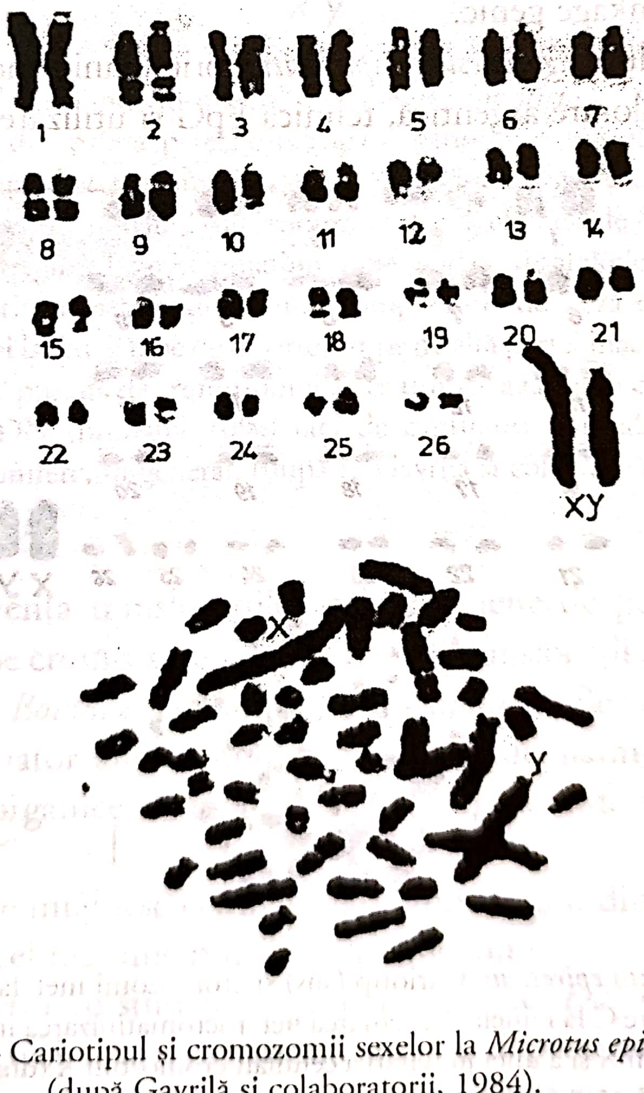


Fig. 17 — Cariotipul și cromozomii sexelor la *Microtus epiroticus* (după Gavrilă și colaboratorii, 1984).

La femelă, unul din cei doi cromozomi X suferă heterocromatinizare.

La speciile la care X este mai mare decât tipul original reprezentat de 5% din complemetul haploid, toată cantitatea în exces din celulele somatice femele devine heteropicnotică, astfel că, funcționează cu o remarcabilă exactitate, de regulă numai 5% din materialul genetic, (exact tipul original), chiar dacă el reprezintă 20%. Este un mecanism precis de compensare a dozei genelor X-lincate (lionizare), la cele două sexe (fig. 18, 19).

Cromozomul X a provenit din aceeași pereche de autozomi cu cromozomul Y (Ohno și colab. 1964), dar Y a degenerat genetic prin deleții succesive sau heterocromatinizare, păstrând active doar genele masculinizării, pe când cromozomul X a păstrat genele de sex, distribuite pe toată lungimea sa astfel că, au fost permise puține modificări structurale, păstrând grupa ancestrală de linkage genic.

La marsupialul *Lagorchestes caspicillatus,* prin tehnici moderne de bandare (bandare G, colorare argentică, tehnica FpG și utilizarea fluorocromilor)

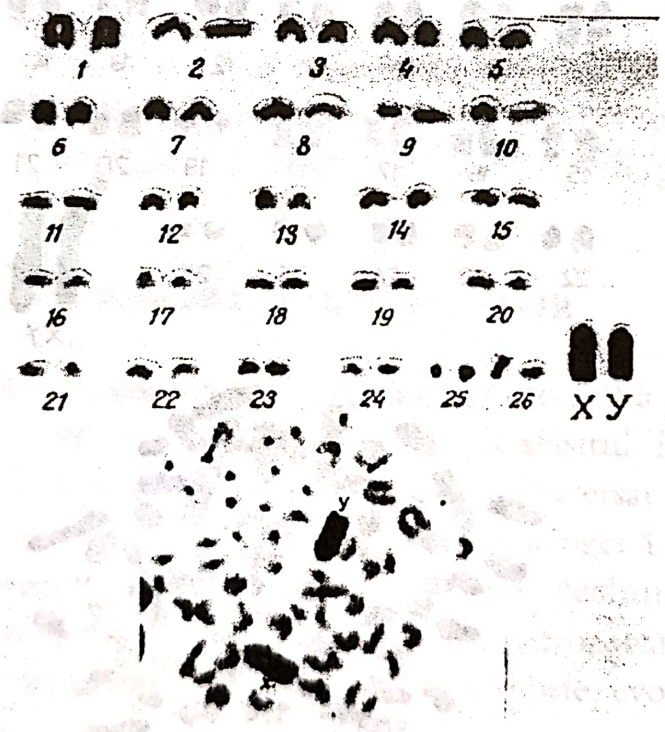


Fig. 18 — *Microtus epiroticus.* Cariotip (sus) și cromozomi metafazici (jos) colorați prin tehnica de bandare C la femelă. Se remarcă heterocromatinizarea integrală a unuia dintre cei doi cromozomi X și a unei jumătăți a celuilalt cromozom X (după Lungeanu, Gavrilă, Stepan și Murariu, 1985).

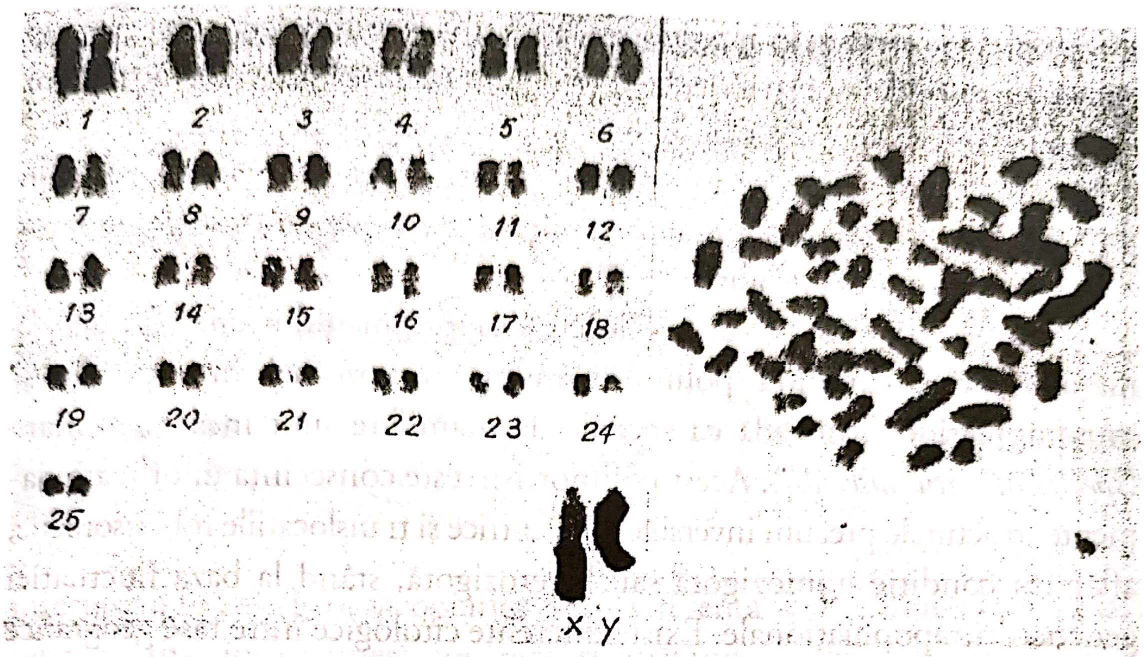


Fig. 19 — Cariotipul unui individ mascul de *Microtus epiroticus* ce prezintă inversie a unuia din autozomii din prima pereche (stânga – cariotip ♂; dreapta – cromozomi metafazici). A se remarca heterocromatinizarea aproape în întregime a cromozomului Y și heterocromatinizarea unei jumătăți din cromozomul X. La femela de *M. epiroticus* apare un cromozom X, în întregime heterocromatinizat, pe când cel de al doilea este pe jumătate heterocromatinizat, prin aceasta realizându-se compensația de doză de gene X-lincate (lionizarea) la mascul și la femelă, pe de o parte, iar pe de altă parte, inactivarea a jumătate din informația genetică purtată de cromozomul X, ca urmare a faptului că, acesta cuprinde cantitate dublă de ADN (probabil 10%) față de cantitatea normală de 5% cât are cromozomul X, la mamifere, în general. (după I.. Gavrilă și colab., 1985).

s-a evidențiat prezența translocațiilor robertsoniene de pe autozomi pe cromozomul Y și pe cromozomul X. Asemenea translocații s-au evidențiat și la unele specii de *Bovidae,* din familia *Tragelaphidae* (Bernischke, 1980). Rezultă că, asemănător autozomilor și heterozomii mamiferelor au fost supuși evoluției organice a materialului ereditar, suferind remanieri cromozomale.

La marsupiale se întâlnesc cei mai mari cromozomi, dintre mamifere, dar au în general, cel mai mic număr de cromozomi.

Hayman și Martin au studiat 5 specii ale familiei *Dasyuridae*, acestea prezentând cariotipuri foarte asemănătoare, fiind prezente doar câteva variații. Ignorând aceste variații, pe baza cromozomilor asemănători, autorii au reușit să construiască un „cariotip standard“. Pornind de la acest cariotip standard, ei au schițat presupusele interschimburi între brațele cromozomilor asemănători („standard“), care au dat naștere variațiilor cariotipice, în cadrul acestei familii. În timp ce numărul de cromozomi a rămas constant, în întreaga superfamilie, au apărut câteva modificări ale morfologiei cromozomilor pe parcursul evoluției.

Un aspect definitoriu al evoluției comportamentului cromozomal la mamifere este existența polimorfismului cromozomal intraspecific și intrapopulațional, dovadă că speciile de mamifere sunt încă în formare (*species in statu nascendi*). Acest polimorfism este consecința unor rearanjamente structurale precum inversiile pericentrice și translocațiile robertsoniene, aflate în condiție homozigotă sau heterozigotă, stând la baza fluctuației genetice intrapopulaționale. Există diferențe citologice între rase geografice sau între rase ecologice, care uneori creează dificultăți în realizarea de hibrizi

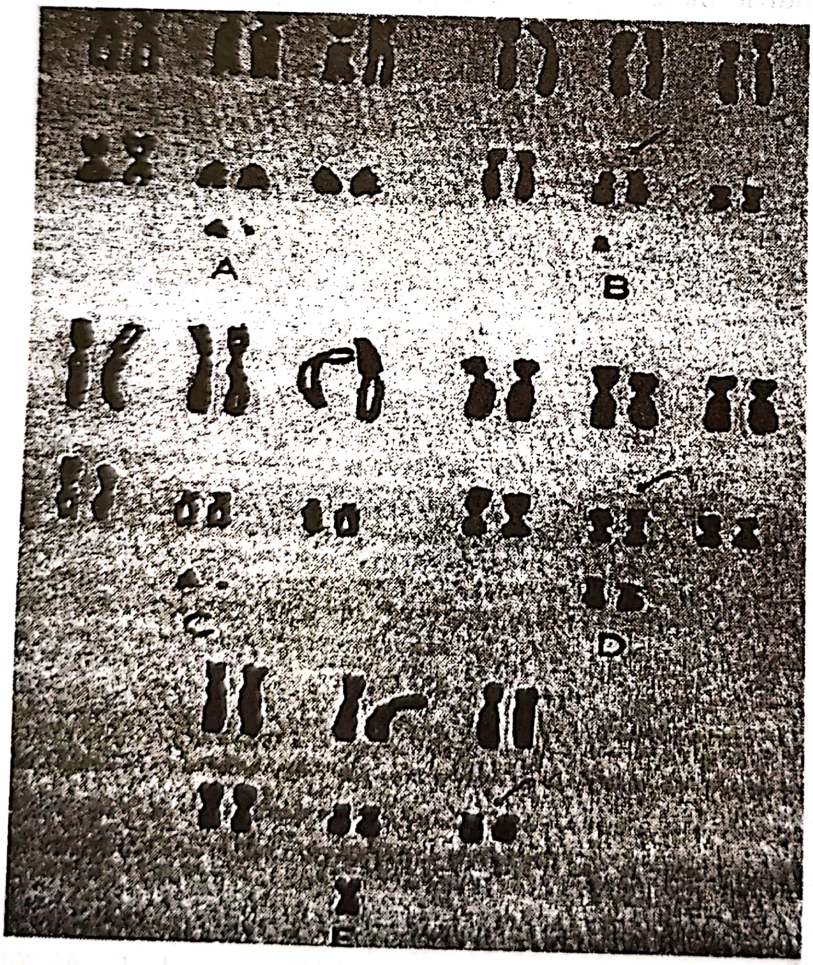


Fig. 20 — Cariotipurile a 5 reprezentanți ai marsupialelor, ce prezintă $2n = 14$
A. *Acrobates pygmaeus*
B. *Sminthopsis crassicaudata*
C. *Caluromys Derbianus*
D. *Vombatus ursinus*
E. *Perameles nasula* ($2n = 13$)
Săgeata indică cromozomii care prezintă sateliți.

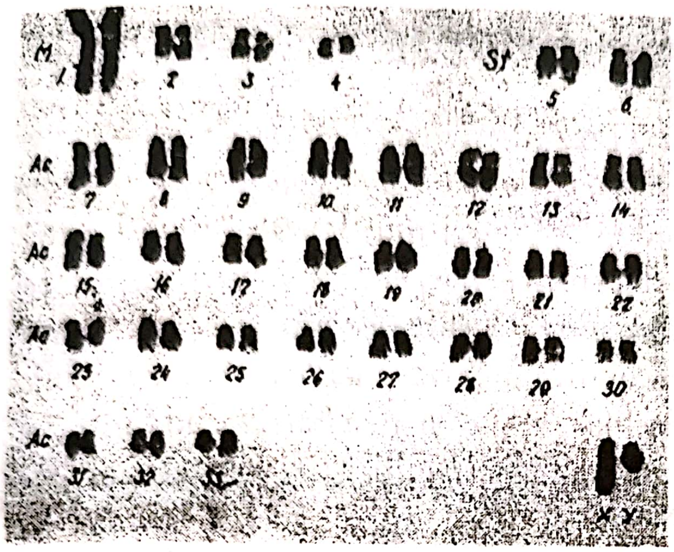


Fig. 21 — Modelul de bandare G al complementului cromozomal la specia *Micromys minutus* (original, Lungeanu, Gavrilă, Stepan, Murariu, 1984).

interrasiali în zonele biogeografice de interferență, în condițiile unei izolări reproductive încă imperfecte, rareori apărând hibrizi superiori raselor. Rearanjamentele structural cromozomale stau la baza unui polimorfism genetic balansat, asigurând heterozigoția și heterozisul favorizat de selecție (White, 1973).

Grupul rozătoarelor se află în plină evoluție. La *Rattus rattus* (șobolanul negru) din Asia, există trei rase geografice, care prezintă un polimorfism cromozomal intraspecific: șobolanul asiatic are 2n=42, șobolanul ceylonez are 2n=40, pe când șobolanul din Oceania are 2n=38. Perechile de cromozomi 9 și 13 prezintă polimorfism. Datele citotaxonomice actuale pun la originea șobolanului ceylonez și din Oceania, șobolanul asiatic.

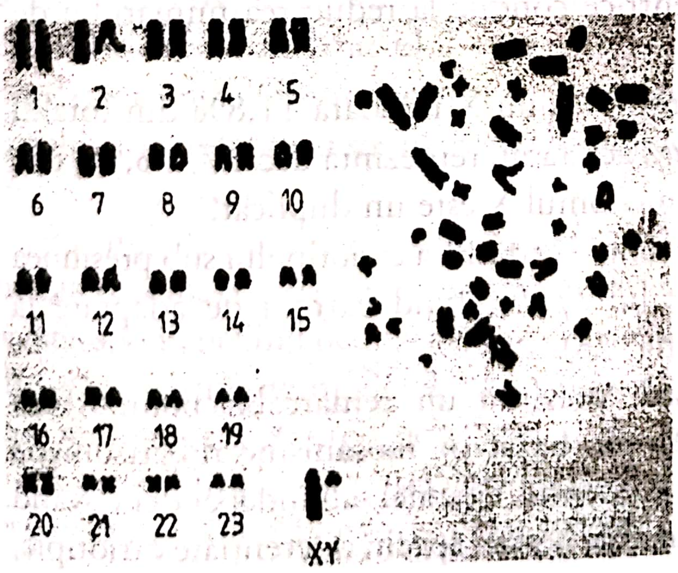


Fig. 22 — Cariotip (stânga) și cromozomi metafizici (dreapta) la *Apodermus agaricus*. Colorație convențională. Cromozomul X are aceeași dimensiune cu perechea I de acrocentrici. Cromozomul Y are aceeași dimensiune cu cromozomii din perechea 18 (original, Lungeanu, Gavrilă, Murariu, Stepan, 1986).

Evoluția s-a realizat pe calea fuziunii robertsoniene succesive a perechilor 11 și 12 și apoi, a perechilor 4 și 7.

Șobolanul nordic (din Japonia) prezintă o inversie în cromozomul 13, care apare și la șobolanul asiatic. Șobolanul negru (*Rattus norvegicus*) prezintă un cariotip similar comun (Joshida, 1973; Masujii, 1970). Ambele specii au perechile 1 și 9 constant subtelocentrice, dar, la *R. norvegicus,* perechea 13 prezintă un polimorfism acrocentric și subtelocentric. Mecanismele robertsoniene de fisiune – fuziune centrică sunt cele mai frecvente în evoluția cariotipului mamiferelor (Bernischke, 1969) și mai rar, are loc inversia pericentrică, așa cum apare la reprezentanții familiei *Cricetidae*, cum ar fi *Permyscus,* din America de Nord, la care apare același număr de cromozomi în garnitura diploidă, dar numărul fundamental de brațe cromozomale (NF) este diferit.

La *Mus minutoides* , Matthey (1964) a evidențiat inversii pericentrice. Mecanismele robertsoniene nu exclud mecanismul inversiei pericentrice. La șoarecele african *Mus minutoides musculoides,* 2n, în diferitele populații, variază între 18 și 34, dar NF = 36, operante în această variație fiind deci mecanismele robertsoniene. La aceeași specie însă, Matthey (1964) semnalează o inversie pericentrică. La reprezentanții familiei *Sciuridae, Tamias* și *Spermophylus* s-au descris numeroase inversii pericentrice.

Speciile *Mus dhunni* și *Mus booduga* din India sunt simpatrice, identice morfologic, dar distincte prin formula cariotipică. *Mus dhunni* are 2n=40 și NF = 49 – 52 variația intrapopulațională fiind datorată inversiilor pericentrice, rezultând forme care sunt însă interfertile.

În unele cazuri, fuziunile centrice conduc la reducerea numărului de cromozomi la 2n=39.

Deoarece, la *Mus dhunni*, cromozomul X măsoară 11,8% din totalul setului diploid, iar la *Mus booduga* acesta nu reprezintă decât 7,3%, s-a tras concluzia că la *Mus dhunni* cromozomul X este un duplicat.

Genul *Spalax* este un caz de evoluție extremă a cariotipului sub presiunea selecției naturale, cârtițele genului *Spalax* fiind extrem de adaptate la condițiile de mediu subteran. (fig. 23)

Spalax ehrenbergii, din Israel, prezintă un remarcabil polimorfism cromozomal cu 2n=52, 54, 58, 60, bazat pe mecanisme robertsoniene bidirecționale (metacentric ↔ acrocentric) paralel sau independent având loc și inversii pericentrice. Populațiile acestei specii, diferențiate cariotipic,

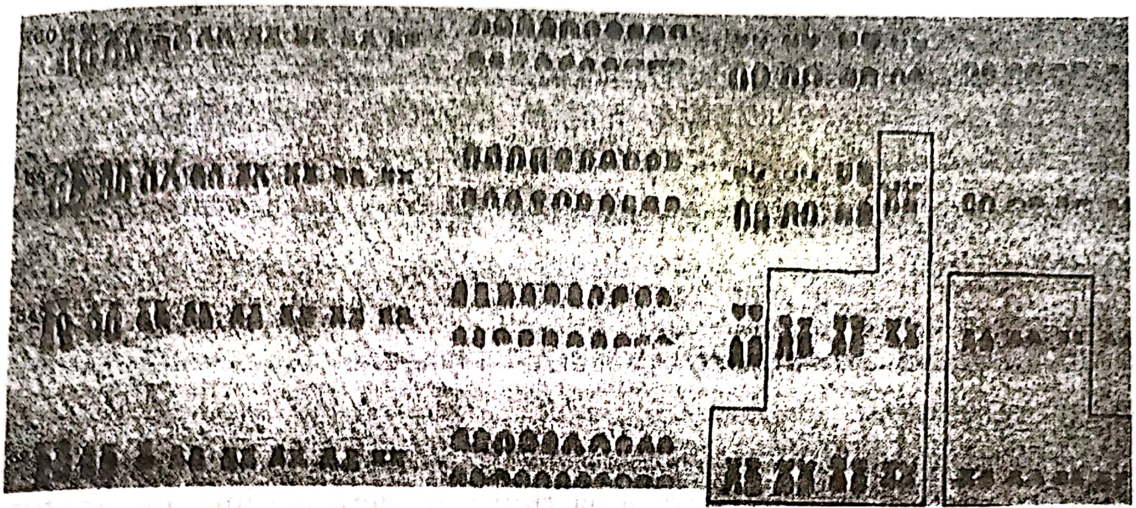


Fig. 23 — Comparație între cromozomii a patru dintre cele mai comune cariotipuri ale genului *Spalax*. Cromozomii metacentrici din grupele B și C sunt încadrați (după Wahrman și colab., 1969).

se exclud din areal. Numai rareori, la zonele de interferență, apar hibrizi (ex. 2n: 58 X 60 = 59), specia aflându-se în plin proces evolutiv.

Consanvinizarea și comportamentul variabil de la o zonă la alta stau la baza izolării reproductive între populații, asigurând discontinuitatea în evoluția speciei și generând forme noi (speciație).

Variațiile numerice și structurale ale cromozomilor au prezentat un avantaj selectiv, pe măsura extinderii arealului în condiții tot mai diferite din zonele aride ale Israelului, realizându-se combinații favorabile de gene coadaptate rezultate în urma rearanjamentelor structurale. Când aceste combinații de gene nu sunt favorabile individului, apariția crossing-overelor poate aduce avantaj.

Formula cromozomală a lui *Spalax ehrenbergii* din Israel (specie sud-est mediteraneană) corespunde unor tipare geografice și climatice bine conturate acestei specii, nefiind necesare pentru izolarea reproductivă, bariere geografice distincte, cerute de modelul clasic al speciației alopatrice, datorită slabei sale mobilități și strictei specializări la mediu.

În grupul Insectivora, speciația s-a realizat, de asemenea, pe calea remanierilor cromozomale. Astfel, dacă speciile *Sorex minutus, S. isodon* și *S.*

caucutiens seamănă din punct de vedere morfologic, ele sunt net distincte din punct de vedere cariotipic. Există însă, și reversul: speciile *Neomys anomalus milleri* și *N. fodiens* prezintă cariotipuri cvasiidentice. La alte specii apare polimorfismul interspecific, diferențiind net speciile înrudite (*Crocidura leucodon leucodon* 2n=28; *C.suaveolens* 2n=40; *C. russula russula* 2n=42). Există și polimorfism intraspecific la insectivore în cazul speciei *Sorex araneus*, care are două tipuri cariologice; tipul A cu 2n=23 și NF=42 și tipul B cu 2n=21–23 și NF=40. Formula heterozomilor este XX femelă și XY_1Y_2 mascul.

Trivalentul sexual este specific celor două tipuri, fiind primar și stabilit înainte de scindarea lor. Cele două tipuri au derivat dintr-un cariotip primitiv, existent înainte de glaciațiune, prin fisiuni și fuziuni centrice. Formele cariologice A și B de *S. araneus* sunt istoric constituite, reprezentând specii incipiente. Forma A se întâlnește în populațiile din insulele Jersey, M-ții Jura și Alpi, pe când forma B se întâlnește în insulele Marii Britanii. Cele două forme se întâlnesc împreună în M-ții Alpi, valea Champery, dar nu dau hibrizi. Prezența în Marea Britanie exclusiv a tipului B, este interpretată prin aceea că, în momentul separării insulelor Arhipelagului Britanic de continent, pe tot continetul era numai tipul B, iar în insula Jersey era și tipul A. Tipul B nu putea ocupa insula, deoarece trăiește la altitudini mari (peste 1000 m). Tipul A trăind mai la sud, după glaciațiune a avansat venind în contact cu tipul B, dar acumulase multe modificări în structura sa genetică, deși aceste forme sunt actualmente simpatrice în unele zone, fiind morfologic cvasiidentice.

Metodele moderne de caracterizare moleculară a genomului unei specii pot aduce mai multe informații privind evoluția acesteia.

Modalitatea prin care variația genetică este partiționată în și între populații din diferite zone geografice este rezultatul istoriei și evoluției speciei.

Astfel, evenimentele paleogeografice din Europa au avut o mare influență asupra structurii genetice a speciilor actuale.

În timpul glaciațiunii pleisocenice majore, cele mai multe specii au fost izolate în partea de sud a Iberiei, Italiei, Balcani și Caucazia. În aceste refugii, populațiile au putut fi izolate pentru mii de ani în timpul fiecarei perioade glaciare și apoi, au migrat spre nord în momentul în care clima s-a ameliorat.

Studiile filogenetice urmăresc să determine relațiile dintre structura genetică prezentă a unei specii, istoria și originea geografică.

Analizele moleculare referitoare la caracterizarea locilor pentru izoenzime și secvențierea ADNmt joacă un rol semnificativ în aceste studii (Avise și colab., 1987; Avise, 1994).

Distributia generala a ADN, ce poate fi interpretată în relație cu istoria climatică a Pleistocenului în Europa, a fost recent obținută pentru lăcuste (Cooper si colab., 1995), albine (Garney si colab., 1992, 1995), șoarece (Nachman si colab., 1994; Boursot și colab., 1996; Din și colab., 1996), iepuri (Hardy și colab., 1995) și urși (Taberlet & Bouvet, 1994, Kohn și colab., 1995).

Ariciul european aparține genului *Erinaceus* și este prezent de-a lungul Europei pana la Munții Urali, și din Scandinavia în Turcia și „Estul apropiat".

Sunt cunoscute 2 specii: *Erinaceus europaeus,* din vestul Europei și *Erinaceus concolor* (inițial numit *E. roumanicus*), cu o distributie estică.

Există o zonă de suprapunere, și posibil, o zonă de hibridare a celor două specii. Această zonă se întinde din Balcani spre granița dintre Italia și Slovenia. O altă zonă de contact se întinde din estul Lituaniei până aproape de Kirov. (fig. 24)

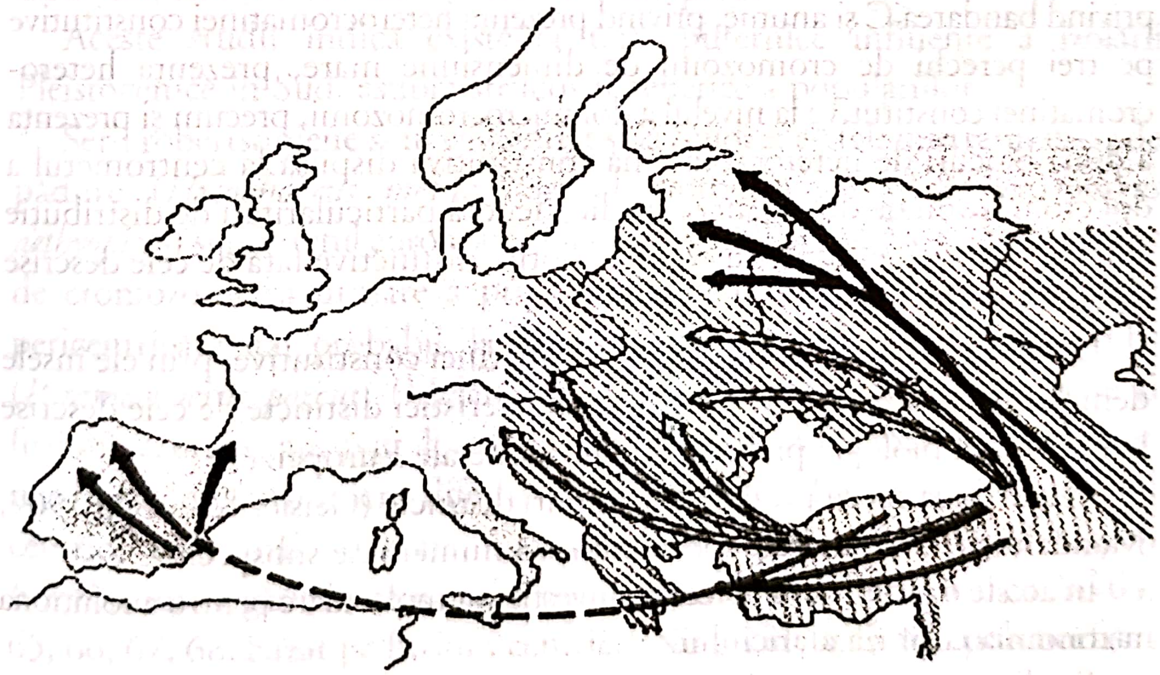


Fig. 24 — Harta distribuției geografice a speciilor de *Erinaceus europaeus* (liniile verticale) și *Erinaceus concolor* (liniile orizontale) (după Groop A., 1969).

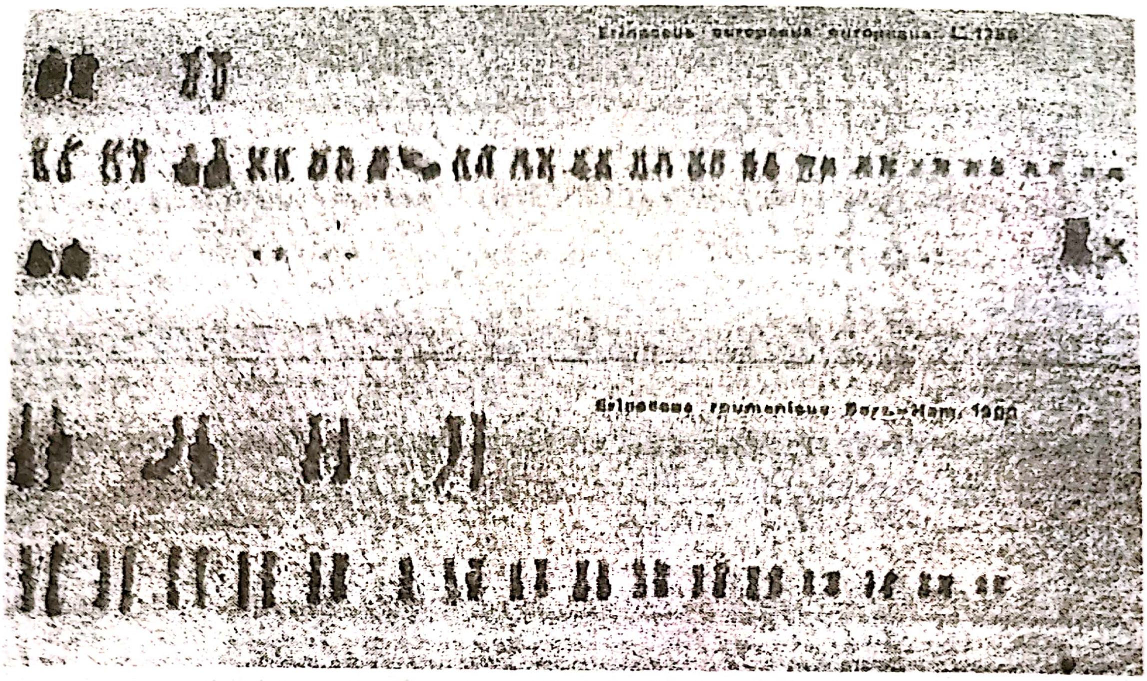

Erinaceus europaeus europaeus L. 1758
Erinaceus roumanicus Barr-Ham. 1900

Fig. 25 — Prezentarea comparativă a cariotipului după marcarea cu^{3}H – Timidină a celor două specii de arici european (după Groop A., 1969)

Datele obținute prin studiile efectuate de Gavrilă si colaboratorii (1998) privind bandarea C și anume, privind prezența heterocromatinei constitutive pe trei perechi de cromozomi de dimensiune mare, prezența heterocromatinei constitutive la nivelul a doi microcromozomi, precum și prezența a două blocuri de heterocromatină constitutivă dispusă la centromerul a doi cromozomi de dimensiune medie, denotă particularități de distribuție a heterocromatinei constitutive în cariotip, distinctive față de cele descrise de alți autori.

Datele privind distribuția heterocromatinei constitutive, prin ele însele demonstrează doar că este vorba de caracteristici distincte de cele descrise la materialul biologic prelevat din alte zone ale Europei.

Aceste doua specii prezintă cariotipuri distincte (Geisler & Gropp 1967, Mandahl, 1978). Ambele specii cuprind numeroase subspecii.

În aceste condiții, sunt necesare investigatii moleculare pentru a soluționa taxonomia confuză a ariciului.

Studii recente s-au oprit asupra analizei ADN genomic, utilizând enzime de restricție (Baunikova si colab., 1996) și variația microsateliților la *Erinaceus europaeus* (Bacher S. A. & Griffiths R., 1997)

Baunikova și colab. (1996) au supus ADN genomic de la arici *(Erinaceidae)*, digestiei enzimatice cu endonucleaze de restricție (Sau 96 I, Bsp 143 I, Csp 6 I, Taq I, Hinf I, Msp I, Eco 130 I, Bcn I, Bsu R). Produșii obținuți au fost separați electroforetic în gel de poliacrilamidă. Fragmentele de ADN constând în secvențe genomice înalt repetitive au fost detectate ca un set de benzi corespunzând la fragmente cu lungimi cuprinse între 30–500 pb. Compararea pattern-ului de restricție la speciile analizate relevă prezența unor benzi specie-specifice. Prin metoda parsimoniei („*parsimony method*") s-a construit arborele filogenetic, iar concluzia a fost că, speciile de arici din arealurile aride sunt clar distincte de speciile de pădure.

Filippucci & Simson (1996) au utilizat polimorfismul alozimelor autozomale pentru a investiga distribuția variației genetice raportată la distribuția geografică a genului *Erinaceus*. Datele indică un nivel considerabil de divergență între *Erinaceus concolor* din Turcia și Israel și *Erinaceus concolor* din Balcani, conducând la concluzia că, una din subspeciile descrise anterior *Erinaceus roumanicus,* este o specie separată. In cadrul speciei *Erinaceus europaeus*, populatiile iberiene apar a fi distincte de alte populații europene, sugerând că taxonul numit *Erinaceus hispanicus* ar putea reprezenta o specie distinctă, strâns înrudită cu *Erinaceus europaeus*.

Aceste studii indică existența unei puternice influențe a izolării Pleistocenice în Sud, asupra structurii genetice a populațiilor.

Serii robertsoniene s-au evidentiat și la Suidae: astfel, mistrețul uriaș de pădure (*Hylochoerus meinerthageni)*, porcul cu negi (*Phacoehoerus aethyopicus*) și mistrețul european (*Sus scrofa*) au NF = 30, dar numere diferite de cromozomi ca urmare a proceselor de fuziune centrică. O inversie pericentrică a stat probabil, la baza apariției altei specii, porcul de tufiș (*Potamochoerus porcus*) (Melander, 1980). Translocații robertsoniene și fuziuni centrice au avut loc și la Cervidae, la care apar polimorfisme intraspecifice cu numere diferite de cromozomi. Populațiile cu fuziuni centrice sunt mai adaptate. La cerbul de Manciuria (*Cervus nippon hortulorum*) s-a găsit un remarcabil polimorfism intrapopulațional cu 2n=64, 65, 66, 67, 68, bazat pe fuziuni centrice. Nu s-a identificat și polimorfism intraindividual.

Polimorfism intrapopulațional a fost remarcat și la cerbul japonez *(Cervus nippon nippon)*, generând trei subspecii. Speciile *Cervus nippon, C. elaphus,* *C. jesoesins* și *Dama dama* au 2n=68. Cariotipul de bază din care au derivat celelalte cariotipuri a fost cel de la *C. nippon*.

Mamiferele placentare actuale prezintă o mare diversitate a cariotipului. În evoluția lor, au fost eficiente remanierile cromozomale, dar rapida lor diversificare s-a realizat pe baza complexității genomului lor, marilor posibilități de autoreglare și alterării grupelor inițiale de linkage, constituindu-se grupe de gene coadaptate. Limita superioară a variației numărului de cromozomi este înregistrată la căprioarele din genul *Muntjacus: Muntjacus muntjac*, sau muntiacul indian are 2n = 6 (♀) și 2n = 7 (♂) și *Muntjacus feae* are 2n = 13, pe când *M. reevesi* are 2n = 46, deși toate aceste specii au aceeași cantitate de ADN. În pofida numărului atât de diferit de cromozomi apărut în urma translocațiilor robertsoniene și inversiilor pericentrice, numărul genelor funcționale a rămas aceeași la cele trei specii, care și ele sunt asemănătoare morfologic.

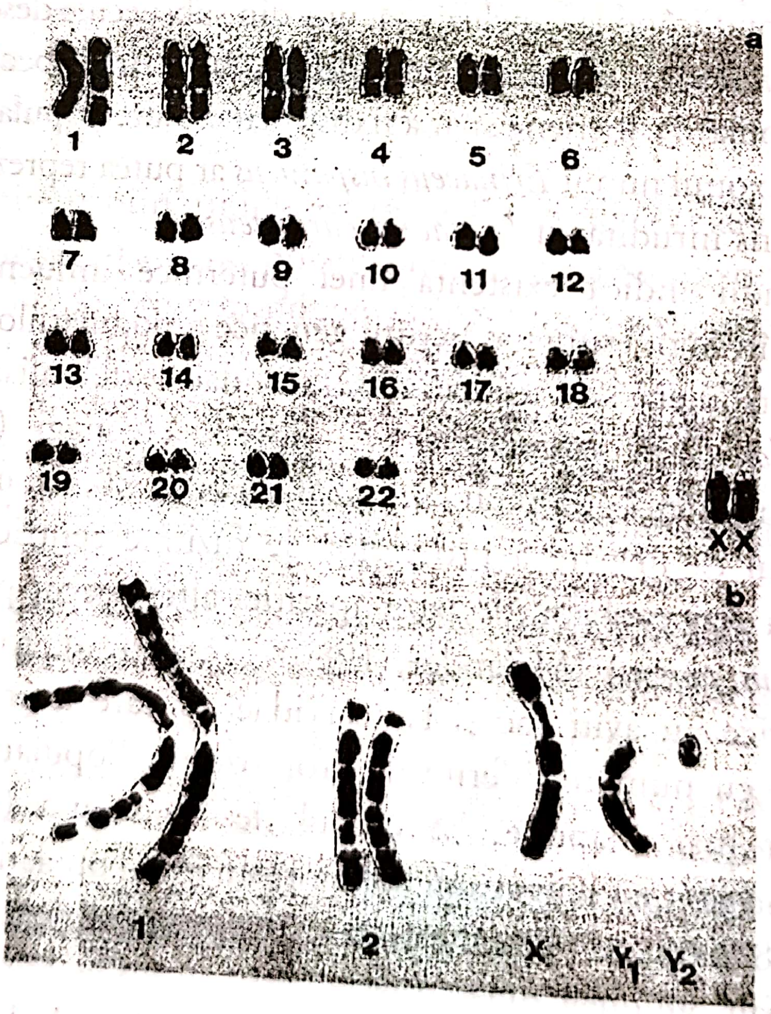


Fig. 26 — Cariotip cu bandare G la *M. reevesi* (a) cu 2n = 46 și *M. muntjac* (b) cu 2n = 7 (după Neitzel, 1987).

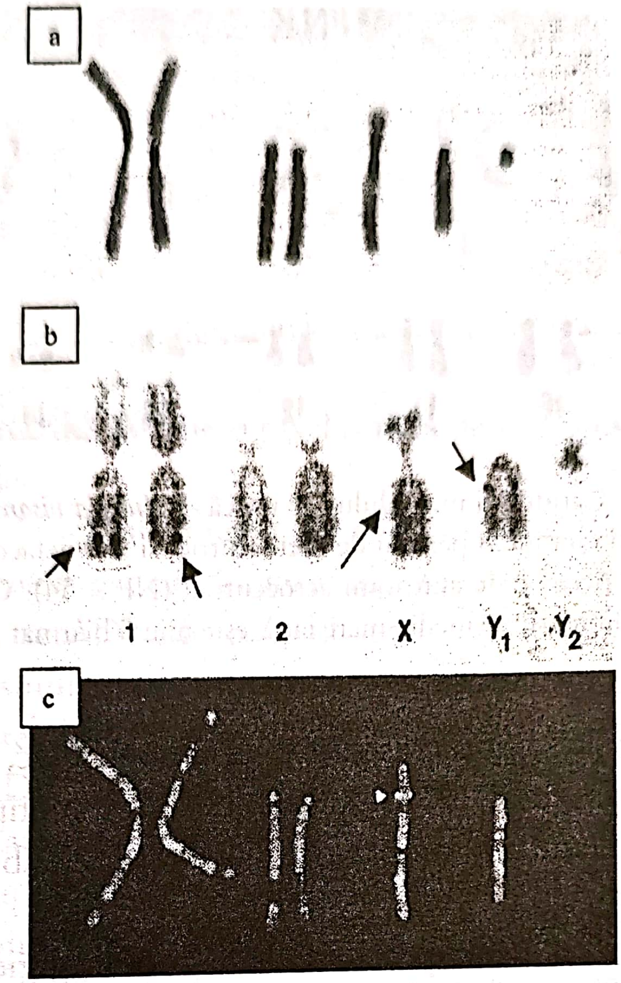


Fig. 27 — Cariotip de *Munjacus muntjac* ♂ 2n= 7; a) distribuția heterocromatinei consitutive în bandare C; b) Regiunile Organizator Nucleolare active (săgețile), evidențiate prin colorație Ag-NOR; c) colorație DAPI, se constată fluorescența puternică a heterocromatinei constitutive pe brațul scurt al cromozomului X (după Neitzel, 1987).

Modificările drastice de mediu intră în contradicție cu genomul speciei. Această contradicție se rezolvă prin dispariția indivizilor care nu fac față nevoilor presiunii selective, menținându-se formele a căror informație ereditară nu contravine supraviețuirii speciei. Rezultă că structura genetică este rodul evoluției organice. Asupra materialului ereditar (genotipul individual) acționează statistic factori perturbatori cu efecte ce se corelează direct proporțional cu gradul de complexitate de organizare și funcționare a genomului, rezultând o relativă independență a evoluției genomului față de evoluția organică. Selecția naturală răspândește modificările ereditare valoroase de la nivelul genofondului populațional, canalizând evoluția

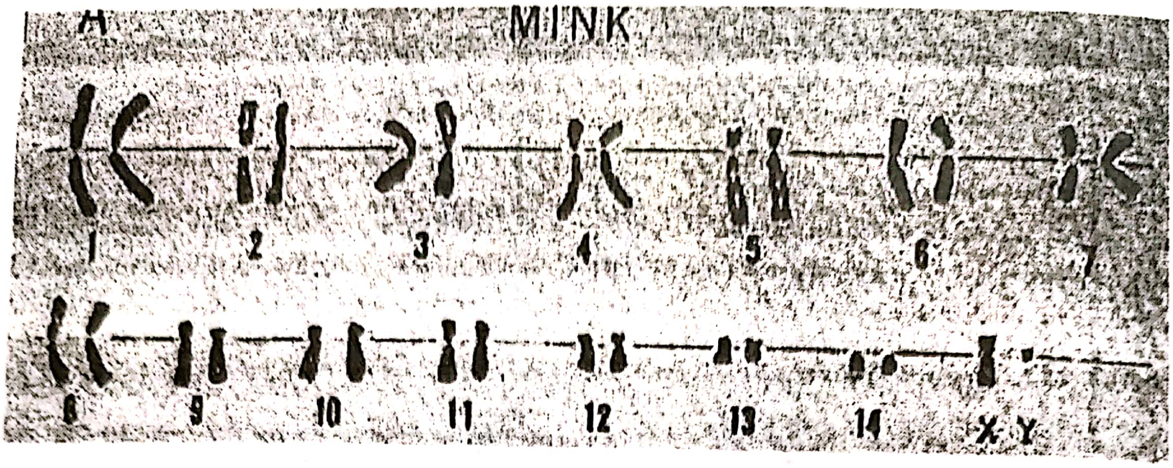


Fig. 28. Cariotipul masculului de nurcă – *Mustela vison*, 2n=30
Setul de cromozomi conține 8 perechi de metacentrici și submetacentrici, 5 perechi de subtelocentrici și o pereche de autozomi acrocentrici (NF = 54). Cromozomul X este submetacentric de dimensiune medie-mare iar Y este mic și biarmat (după Chang M. C. și colab., 1969).

biologică pe o direcție care să asigure progresul biologic, perfectibilitatea, acesta stând la baza naturii istorice a fiecărei specii. Cariotipul oricărei specii devine astfel, rezultatul evoluției istorice unice a speciei sub acțiunea selecției naturale.

La Mustelidae, cel mai important mecanism de evoluție este translocația robertsoniană și modificarea cantității și distribuției heterocromatinei constitutive. Adițiile și delețiile, ca și blocurile heterocromatice autosomale sunt caracteristice familiei. Schimbările respective sunt în corelație cu modificările în cantitatea de ADN. Modificările evolutive par să fi afectat și poziția NOR-urilor destul de frecvent.

7. VARIAȚIA CANTITĂȚII DE ADN ȘI EVOLUȚIA GENOMULUI LA VERTEBRATE

Ohno și colaboratorii (1968) au analizat cantitatea de ADN la un număr de taxoni ai vertebratelor, de la pești la mamifere. După ei, primele vertebrate au avut probabil, un conținut de ADN de 1,4 x 10^{-9} mg/celulă și genomul lor a derivat dintr-un cordat primitiv prin tetraploidie. După geneza primului vertebrat au fost nenumărate încercări de duplicație genică, acestea generând diversitatea genomică și cantități variabile de ADN. Cele mai multe dintre noile tipuri au apărut pe când taxonii erau încă acvatici.

Numărul diploid de cromozomi de 2n=48 acrocentrici, întâlnit la teleosteeni din ordinul Percomorphi, reprezintă probabil cariotipul original fără sau cu puține modificări. Unii taxoni primitivi teleosteeni, precum membrii subordinului Salmonoidea, au dobândit un conținut mare de ADN, apropiat de cel al mamiferelor placentare ($7{,}0 \times 10^{-9}$ mg) în fiecare nucleu diploid.

Alte mecanisme de evoluție la nivel genetic sunt propuse pentru diferite grupe de animale.

La Mantidae, Hughes-Schrader (1951) constată că la două specii strâns înrudite, *Liturgousa mayo,* cu 16 autozomi și *L. cursor* cu 32 autozomi, există același conținut de ADN, în nucleul spermatidelor. Explicația propusă pentru mecanismul evolutiv, în acest caz are la bază implicarea multiplicității laterale de la *L. mayo* care a permis o separare suplimentară a moleculelor ADN, astfel că au putut deriva 32 de cromozomi din cei 16, fără modificarea conținutului de ADN, aici nefiind vorba de un caz de poliploidie, după cum ar putea reieși considerând numărul de cromozomi.

John și Hewitt (1966) au studiat variabilitatea ADN și stabilitatea cariotipului la Acrididae. La Cryptosacci, majoritatea speciilor au 23 brațe cromozomale la mascul. Fuziunile centrice au dat naștere la complemente cromozomale cu 17 cromozomi. Conținutul de ADN din spermatide arată diferențe semnificative printre specii, atât la cele cu 17, cât și la cele cu 23 de cromozomi. La trei specii cu 17 cromozomi, există un conținut de ADN mai mare decât la cele cu 23 de cromozomi. Diferențele acestea în conținutul de ADN se datorează pierderii sau dobândirii de ADN repetitiv, afectând probabil heterocromatina centromerică sau cu altă localizare, astfel că, stabilitatea cariotipului poate fi de fapt, reală și majoritatea genelor pot continua să prezinte aceleași funcții.

Variațiile în cantitatea de ADN pot avea loc la toate nivelurile taxonomice și printre specii strâns înrudite. Variații mari în conținutul de ADN repetitiv pot să se coreleze cu adaptări ecologice, fiziologice sau comportamentale.

Din grupul Felidelor, toate pisicile din emisfera nordică au 2n = 38, iar cele din America de Sud, spre exemplu, au 2n = 36.

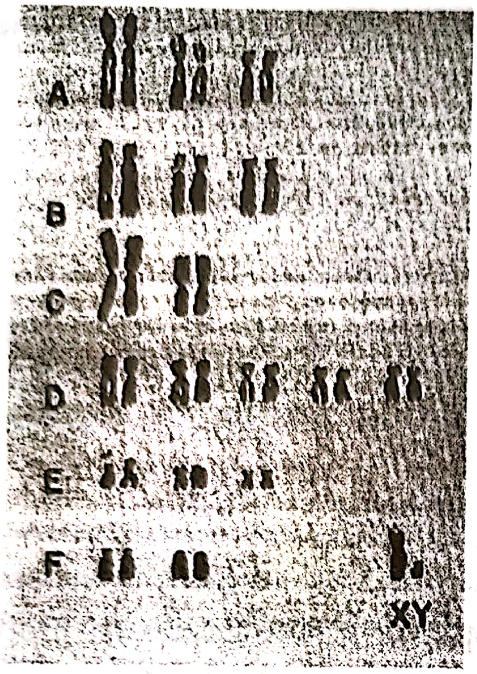


Fig. 29 — Cariotip mascul de leopard *Neofelis nebulosa* (2n=38) (după D.H. Wurster, 1964)

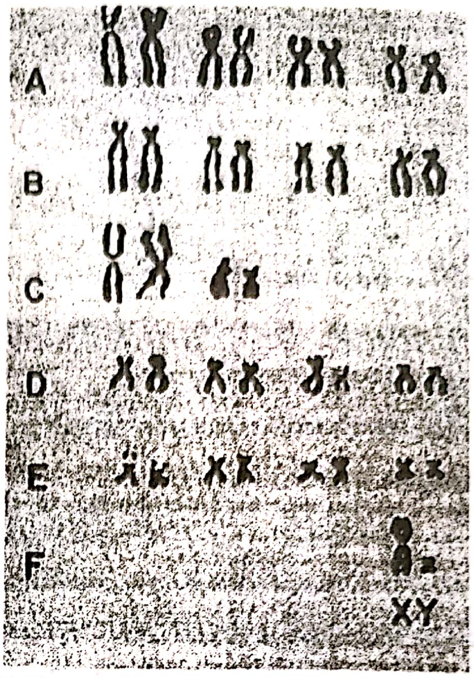


Fig. 30 — Cariotip mascul de jaguar *Felis yagouaroundi* (2n=38) (după D.H. Wurster, 1964)

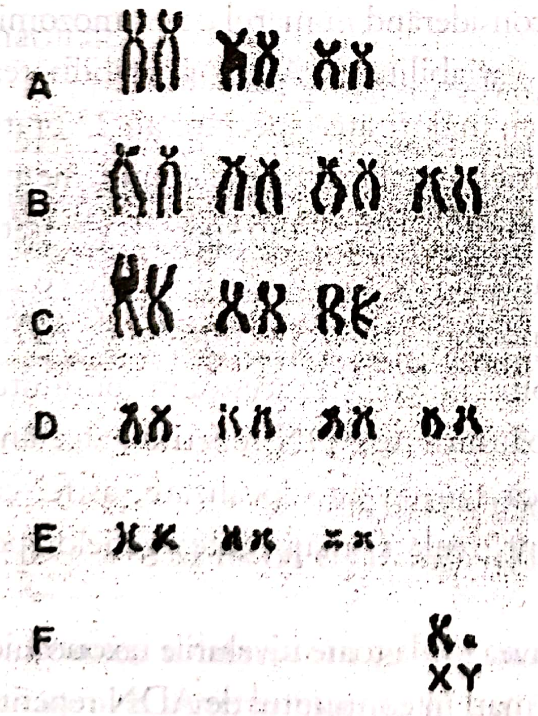


Fig. 31 — Cariotip mascul la *Felis geoffroyi* (2n=36) (America de Sud) (după D.H. Wurster, 1964)

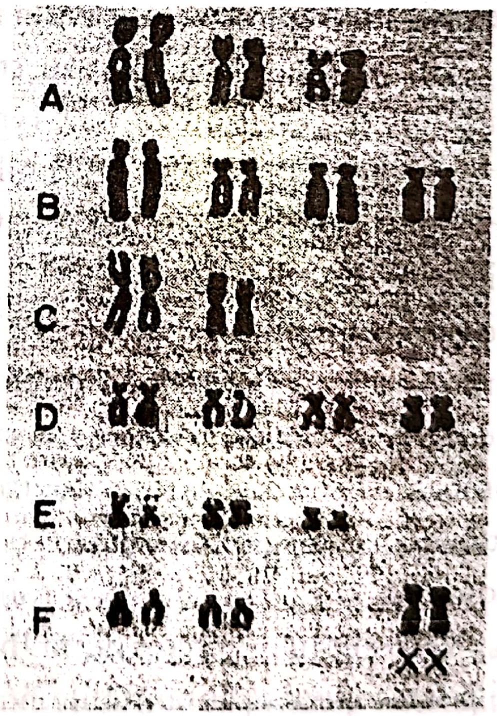


Fig. 32 — Cariotip femel la *Felis temmincki*, pisica galbenă din India (2n= 38) (după D.H. Wurster, 1964)

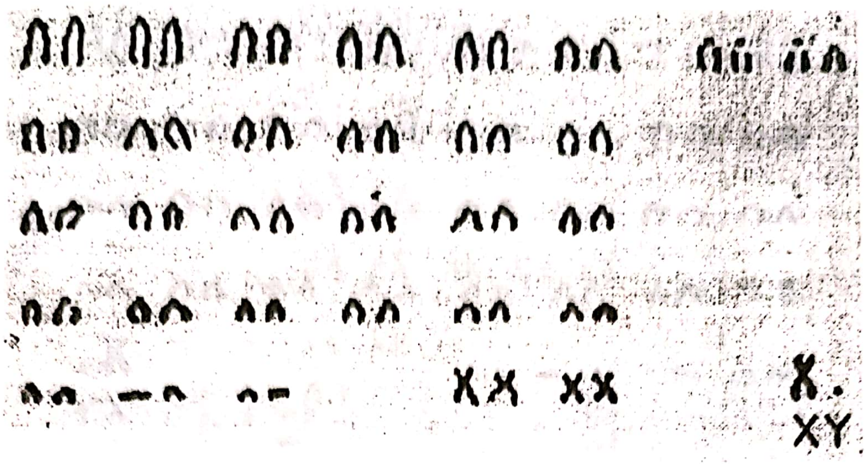


Fig. 33 — Cariotip mascul la fenec *Fennecus zerda* (2n = 64)
(după D.H. Wurster, 1964)

Vulpile, cu excepția vulpii arctice, prezintă cariotipuri cu o medie a numărului de cromozomi cuprinsă între 64 și 76.

În grupul Canidelor, mecanismul fisiunii centrice a fost factorul major al evoluției cariotipului. Genul Canis posedă 2n = 78 și un cariotip uniform. Câinele de vânătoare din Africa (*Lycaon pictus*) are 2n = 78 și un cariotip identic cu toți membrii genului *Canis*, iar un alt câine din America de Sud (*Speothos venaticus)* posedă un cariotip cu 2n = 74 cromozomi (fig. 34, 35)

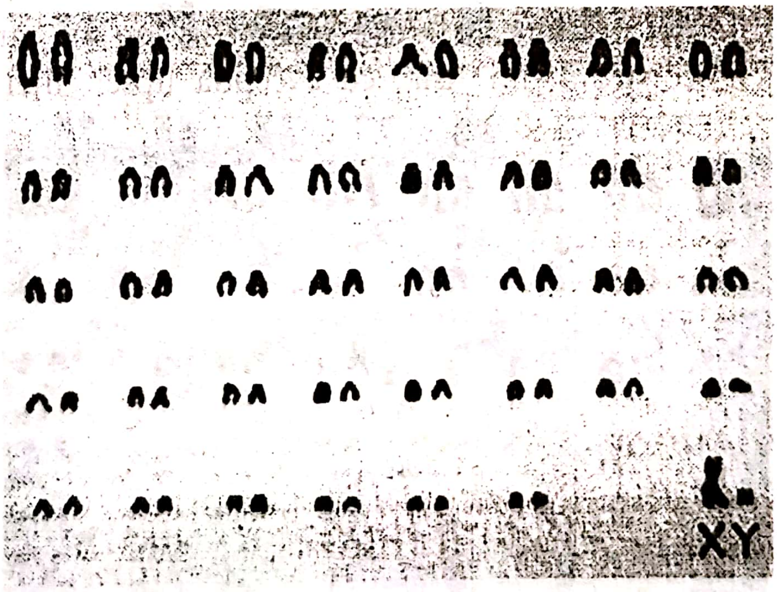


Fig. 34 — Cariotip mascul la câinele de vânătoare din Africa (*Lycaon pictus*) 2n= 78
(după D.H. Wurster, 1964)

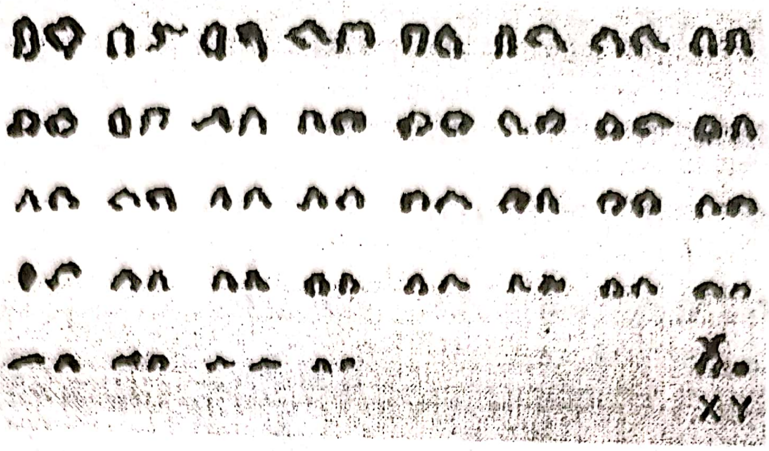


Fig. 35 — Cariotip mascul la *Speothos venaticus*, 2n = 74 (după D.H. Wurster, 1964)

Dintre carnivore, cei mai mulți urși se găsesc în nord, și au cariotipuri identice, având 2n = 74 și un număr fundamental de brațe ce variază de la 84 la 88.

Ursul panda uriaș prezintă un cariotip intermediar, cu 2n= 24, NF =78, apropiat de Ursidae, dar cu markeri cromozomali ce îi apropie de Procyonidae. Procyonidele au fost fosile din America de Nord și au trăit în timpul Miocenului inferior. Ele au migrat în America de Sud, însă există foarte puține date referitoare la prezența lor în Asia. În schimb, ursul panda pitic *Ailurus fulgens* prezintă 2n = 36 (fig. 37) și are un cariotip foarte asemănător cu leopardul din Asia, cu excepția lipsei unei perechi de

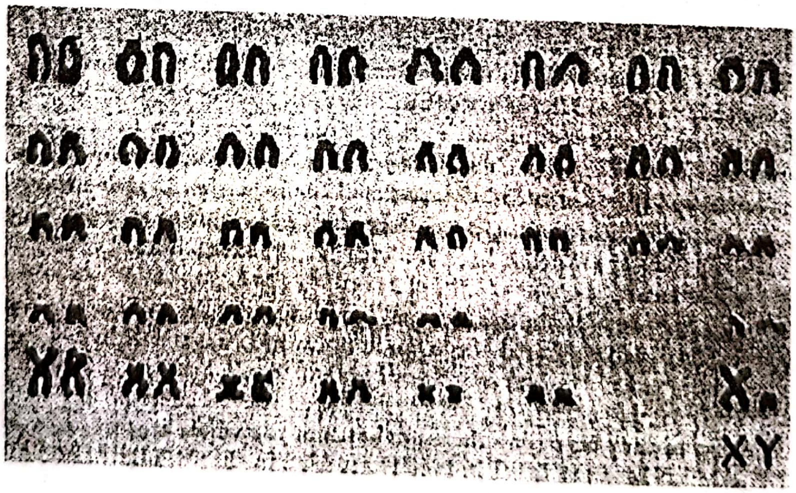


Fig. 36 Cariotip mascul la ursul grizzly *(Ursus horribilis)* 2n =74 (după D.H. Wurster, 1964)

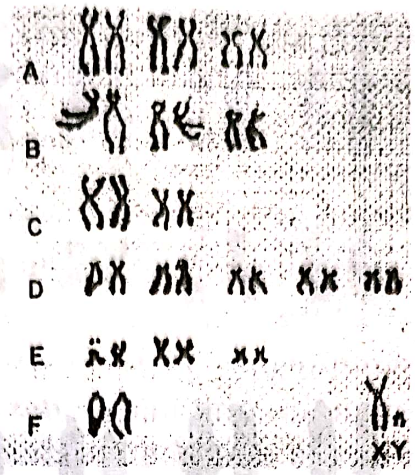


Fig. 37 — Cariotip mascul la ursul panda pitic *Ailurus fulgens* (după D.H. Wurster, 1964)

cromozomi din grupa F. Acesta nu sugerează ca panda pitic ar fi strâns înrudit cu felinele, ci arată paralelismul între Procyoninae, care, de asemenea, prezintă similitudini cariotipice cu felinele.

La Primate, se constată o tendință pronunțată în sensul reducerii numărului de cromozomi și predominanța cromozomilor submetacentrici la formele mai specializate (fig. 38), comparativ cu formele primitive, ce

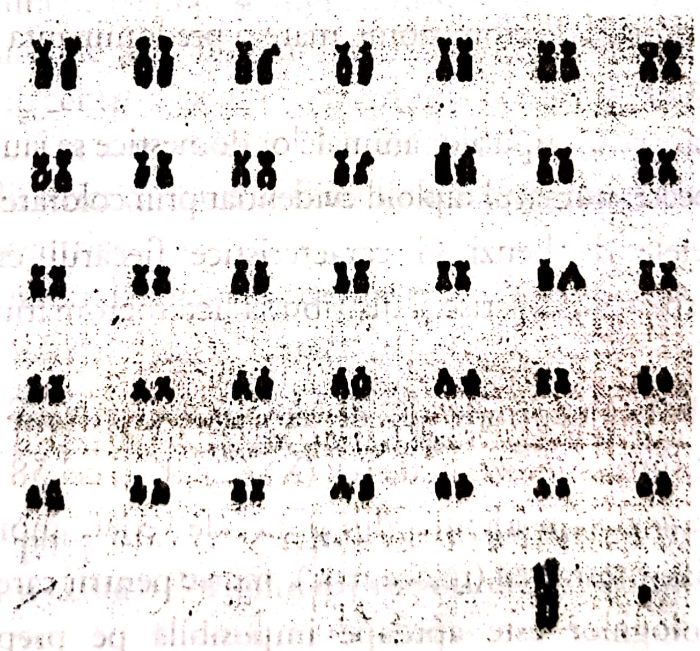


Fig. 38 Cariotip mascul la *Cercopitecus mitis* 2n= 72 (subfamilia Cercopithecinae) (după J. Egozcue, 1969)

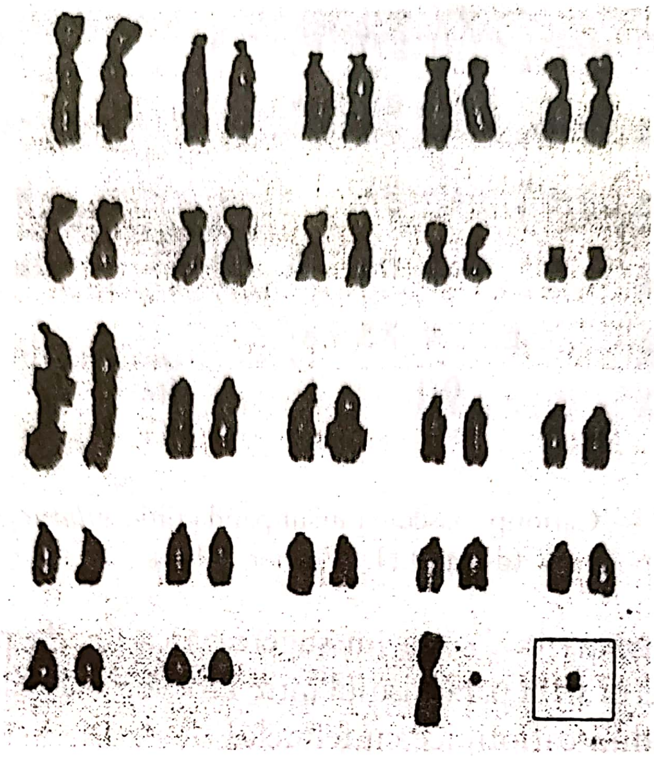


Fig. 39 — Cariotip mascul la *Callicebus moloch* 2n =46:
4 cromozomi metacentrici, 16 submetacentrici și 24 acrocentrici.
Cromozomul X este un submetacentric, iar Y este un microcromozom.

prezintă număr diploid de cromozomi, mare și predominanța cromozomilor acrocentrici (fig. 39).

În caracterizarea cariotipurilor animalelor domestice se iau în considerare următoarele aspecte: numărul diploid evidențiat prin colorare convențională Giemsa, modelele de benzi G caracteristice fiecărui cromozom din complementul speciilor descrise și distribuția heterocromatinei constitutive din genom.

Cariotipul bovin cuprinde 60 de cromozomi, dintre care 58 sunt autozomi, iar 2 sunt cromozomi de sex (X și Y). Toți cei 58 de cromozomi ai speciei *Bos taurus* sunt identici din punct de vedere morfologic, având centromerul plasat terminal (telocentric), motiv pentru care recunoașterea corectă a omologiilor este aproape imposibilă pe preparate colorate convențional. Cei doi cromozomi ai sexului X și Y sunt submetacentrici, făcându-i ușor identificabili.

Numărul diploid de cromozomi la oaia domestică (*Ovis aries*) este de 54. Cariotipul cuprinde 26 de perechi de autozomi și 2 cromozomi de sex. Perechile de autozomi 1, 2 și 3 sunt metacentrice, iar restul sunt telocentrice. Cromozomul X este cel mai lung telocentric din complement, iar cromozomul Y este cel mai mic metacentric din set.

Capra domestică are un număr diploid de 60 cromozomi. Toți cei 58 de autozomi, ca și cromozomul de sex X sunt acrocentrici. Uniformitatea morfologică a autozomilor, ca și dimensiunile foarte apropiate, fac imposibilă identificarea omologilor prin colorație convențională. Singurul cromozom ușor identificabil este Y, care este și cel mai mic metacentric din set.

Numărul diploid de cromozomi în cariotipul calului domestic (*Equus caballus)* este de 64. Autozomii pot fi grupați în 13 perechi de cromozomi biarmați și 18 acrocentrici (NF = 88). Cromozomul X este metacentric, iar Y este un acrocentric mic.

Transpoziția este un rearanjament de segmente cromozomale care poate apare ca urmare a două fragmentări de o parte a centromerului, plus o fragmentare adițională la un alt situs într-un braț cromozomal. Dacă aceste trei fragmentări sunt suficient de apropiate, segmentul centromeric poate să intre în ruptura de pe braț, schimbându-se astfel poziția sa, capetele rupte de pe cele două fețe ale sale reunindu-se. Adesea, asemenea transpoziții modifică poziția centromerului și determină confundarea lor cu inversiile pericentrice. La om s-au descris 21 asemenea inversii pericentrice numai pe bază de studii strict cariotipice și multe alte asemenea cazuri sunt descrise ca inversii pericentrice.

Poliploidia naturală apare la multe specii de pești și la unii amfibieni (*Hyla versicolor, Odontophrynus americanus*), la salamandrele înrudite cu *Ambystoma jeffersonianum* la care s-au descris forme triploide, precum și la șopârle Teiidae, care se dezvoltă partenogenetic, cum ar fi *Cnemidophorus tigris*.

La animale, poliploizii ce se reproduc sexuat apar a fi limitați doar la grupele la care nu există o diferențiere netă, distinctă, a cromozomilor de sex.

8. ROLUL MODIFICĂRILOR DE CARIOTIP ÎN SPECIAȚIA ANIMALELOR

Punctul central al ideii despre mecanismele și cauzele evoluției cariotipului este caracterul dublu al rearanjamentelor cromozomale. Alterarea unui cariotip acționează prin efectele de poziție și numărul grupelor de lincaj asupra expresiei genelor și, în acest fel, asupra proprietăților adaptative fenotipice ale organismului. În același timp, ea are efect asupra abilității unui cariotip de a trece cu succes diviziunea celulară. Fiecare alterare structurală a cromozomilor poate cauza potențial tulburări ale diviziunii celulare meiotice în timpul gametogenezi heterozigoților, afectând astfel fertilitatea organismului. Acumularea diferențelor cariotipice dintre două forme poate duce la sterilizarea completă a hibrizilor lor și la izolarea reproductivă, care este criteriul de bază în delimitarea și existența speciilor. Aceasta înseamnă că există o înrudire strânsă între procesele de diferențiere a cariotipului și speciație. În același timp, se pune problema apariției dezavantajului heterozigoților. White (1978) a studiat 4 factori care conduc la fixarea rearanjamentelor cromzomale: dirijarea meiotică, deriva genetică, consangvinizarea și avantajul selectiv al noului homocariotip. Selecția preferențială a noului homocariotip poate depăși efectele negative ale stării heterozigote asupra fertilității și conduc la fixarea translocației. Bengtsson și Bodmer (1976), Hedrick (1981) și Walsh (1982) au testat modelele posibile ale implicațiilor celor 4 factori, definind totodată condițiile în care poate avea loc fixarea unei noi alterări cromozomale.

Posibilitatea implicării driftului genetic și consangvinizării în răspândirea și menținerea rearanjamentelor cromozomale este determinată, în mare măsură de unele proprietăți biologice ale organismelor, îndeosebi în biologia reproducției și cea populațională. Posibilitatea menținerii noilor alterări este crescută la animalele care dau un număr mare de pui. Înaltul potențial reproductiv permite compensarea pierderilor parțiale ale descendenților indivizilor heterozigoți. Efectele driftului genetic sunt crescute în populațiile mici, izolate, supuse fluctuațiilor majore în decursul timpului.

Semnificația factorilor biologici individuali ai fixării noilor translocații cromozomale este interpretată diferit, prin mai multe teorii. Una din teorii susține că răspândirea și fixarea rearanjamentelor cromozomale ar fi datorate mai ales driftului genetic din populațiile mici și extinderii consangvinizării printr-o anume structură socială (Nevo, 1969; Arnanson, 1972; Wilson și colab., 1975; Bush și colab., 1977; Lande, 1979).

Schimbările în proprietățile ecologice ale populațiilor, semnificația adaptativă a noilor rearanjamente cromozomale, cursul evenimentelor speciației și divergența filetică sunt de fapt, înrudite cauzal în procesul evoluției, iar întregul sistem pare să fie interconectat printr-o serie de feed-back-uri.

Semnificația actuală a schimbărilor cariotipului în filogeneză este bazată pe extinderea variabilității genetice și formarea noilor combinații, prin propria lor adaptabilitate. Consecințele genetice ale evoluției unui cariotip sunt explicate de Wilson (1975) ca schimbări în sistemele reglatoare genetice care au loc independent de evoluția genelor structurale, dar afectează indirect expresia lor și expresia fenotipului genomului. Aranjamentele morfologice ale cariotipului și organizarea regională a cromozomilor au un efect major asupra păstrării complexelor genice coadaptate care sunt foarte stabile în evoluție (Mayr, 1975; Lundin, 1979). Schimbările structurale din cromozomi care conduc la o tulburare a sistemului integrat al supergenelor coadaptative reprezintă, deci, un factor semnificativ în schimbările evolutive ale organismului (Carson, 1975; Reig și col., 1977; Shaw și Coates, 1983).

În afara modificărilor realizate prin restructurări cromozomale, cariotipul animalelor poate evolua prin modificări numerice. Modificările numerice sunt generate la animale prin erori apărute în gametogeneză și fecundație.

Creșterea temporară a frecvenței mutațiilor care afectează procesul de diferențiere a cariotipului poate avea semnificație în speciație (Bickham și Baker, 1980; Yoshida și Parida, 1980).

9. POLIMORFISMUL CROMOZOMAL

Alterarea genetică a cromozomilor care nu are efect nefavorabil, poate fi transmisă la descendenți și răspândită în populație. În cazul în care într-o singură populație există și se mențin mai multe cariotipuri, acea populație se numește polimorfă. Polimorfismul poate apare sub două forme: balansat și trecător (Ford, 1964). În cazul polimorfismului balansat, frecvența morfelor alternative din populație este menținută mai mult timp, deși pot fi fluctuații ciclice. Aceste fluctuații pot avea caracter sezonal, dar ciclurile reapar regulat, în fiecare an, așa că balanța este în continuă reluare. Balanța poate fi menținută pe baza efectului „heterozis"(avantaj adaptativ al indivizilor heterozigoți), a adaptării diferențiate a diferitelor morfe la condițiile de mediu sau prin selecța dependentă de frecvența morfelor.

Într-o populație polimorfă, există de obicei indivizi cu un cariotip standard, indivizi cu un cariotip heterozigot și indivizi cu un cariotip homozigot, pentru o anumită alterare.

Kaina și Rieger (1979) au presupus că sistemele polimorfe acționează asupra frecvenței proceselor de recombinare, afectând astfel, variabilitatea genetică a populației, aceasta fiind menținută pe baza selecției pozitive de grup. Aceste mecanisme pot acționa în special în cadrul polimorfismelor induse prin prezența cromozomilor supranumerari în care apar tulburări de segregare ce fac imposibilă menținerea echilibrului Hardy-Weinberg. Polimorfismul balansat este considerat în mod obișnuit un fenomen adaptativ.

Polimorfismul trecător este caracterizat printr-o creștere a frecvenței unei morfe homozigote, care duce la fixarea ei în toată populația. Este o schimbare gradată în structura cariotipului din populație, fapt ce stă la originea diferențelor cariotipice intrapopulaționale. Apariția unei specii politipice, din punct de vedere cariotipic, poate fi primul pas către diversificarea sa evolutivă. Polimorfismul trecător poate urma unui polimorfism balansat și intră în joc după ce a fost alterată balanța, cum ar fi de exemplu, o schimbare majoră în condițiile de mediu (Mattey, 1967, 1972; Jotterand, 1975). Se pare că polimorfismul balansat nu este un precursor obișnuit al polimorfismului trecător și că cele două tipuri de polimorfism sunt fenomene independente, cu semnificație biologică proprie, specifică.

Variabilitatea numărului de cromozomi nu este tolerată natural în populațiile de mamifere. Există totuși, câteva cazuri de polimorfism raportate până acum, dintre care unul se referă la vulpea argintie domestică. Inițial Makino (1947) a raportat 2n = 38 de cromozomi, dintre care 34 de tip comun și 4 microcromozomi. După cum reiese din denumirea lor, cei 4 cromozomi, care nu sunt de tip comun, sunt foarte mici și se colorează intens (Gustavsson și Sundt, 1967). Deseori, există însă o variabilitate inter- și intraindividuală (Gustavsson și Sundt, 1965, 1967; Sasaki și col, 1968, Gustavsson, 1970). Variația intraindividuală în numărul cromozomilor este implicată prin comportarea neregulată a microcromozomilor în timpul meiozei (Gustavsson, 1970). În prima profază meiotică se formează diferite configurații care depind de numărul microcromozomilor. Datorită numărului mic de chiasme, asociațiile sunt aparent incomplete, rezultând o non-disjuncție în anafază. Numărul diploid variază între 34 și 40: în cazurile cu 2n = 34, au fost eliminați toți microcromozomii.

10. POLIMORFISMUL STRUCTURAL

Sisteme polimorfe produse prin duplicații, deleții și translocații reciproce nu sunt încă raportate la animalele domestice. Cel puțin ultimul tip menționat de mutație structurală mediază o mare reducere a fertilității și probabil nu este tolerată. Alt tip de translocație, denumită în tandem, a fost observată la vaci din rasa Roșie Daneză (Hansen, 1968), dar nu se știe dacă dă naștere unui sistem polimorf. Cea mai comună mutație cromozomală care constituie polimorfism este translocația de tip fuziune centrică. Acest tip de translocație a fost descris la bovine, capre, oi și suine.

Fuziunile centrice produc în mod evident tulburări ale procesului de diviziune meiotică. În prima diviziune meiotică se formează cu regularitate un heterotrivalent între translocația prin fuziune centrică și omologii săi normali (Popescu, 1972). La a doua diviziune meiotică, se formează un număr covârșitor de celule cu număr redus de cromozomi care demonstrează un cariotip haploid echilibrat. Translocația apare în jumătate din numărul spermatocitelor secundare (Popescu, 1972). Totuși, într-un număr mic din celulele gonadale, apar cariotipuri neechilibrate care provin din segregarea non-disjuncțională a cromozomilor translocați, în cea de a doua diviziune meiotică. Gameții neechilibrați funcționează normal la fertilizare, dar zigoții rezultați vor avea cariotipuri neechilibrate și vor muri timpuriu în cursul dezvoltării embrionare.

* Notă: Figurile nr. 1 – 16, 20 sunt reproduse după Chromosome Atlas: Fish, Amphibians, Reptiles and Birds, vol. 1, Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. New York, 1971, Coordinating Editors – **Kurt Benischke, T.C. Hsu**

CAPITOLUL XXXVI

ORGANIZAREA GENOMICĂ LA MAMIFERE

1. STRUCTURA GENOMULUI

1.1. GENUL ELLOBIUS (*CRICETIDAE*)

Genul *Ellobius*, din care face parte și cârtița, reprezintă un sistem model pentru studierea problemei evoluției genomului la mamifere, schimbarea numărului și morfologiei cromozomilor fiind insoțită și de schibări în structura moleculară a genomului. Cariotipul uneia din speciile acestui gen - *E. lutescens*, conține doar 17 cromozomi metacentrici (2n), pe când la alte specii - *E. fuscocapillus* și *E. talpinus* - cariotipul conține 36 și respectiv 54 de cromozomi. Pe de altă parte, una din cele trei forme cromozomale a fost identificată la *E. talpinus*. Pe un areal de 200 km (regiunea Pamir-Altai) *E. talpinus* are o foarte mare varietate a numărului de cromozomi, la același număr de brațe NF=56, ceea ce înseamnă clar funcționarea mecanismelor robertsoniene de fuziune-fisiune centrică care modifică numărul de cromozomi, cu păstrarea aceluiași număr de brațe cromozomale, numit număr fundamental (NF).

Cercetările intense, au permis identificarea a 16 forme cromozomale diferite, la *E. talpinus* (cârtița obișnuită): 2n=31, 32, 33, 34, 36, 38, 40, 42, 43, 44, 46, 48, 51, 52, 53 și 54 (Lyapunova și colab., 1980). Dar, la aceste forme nu au fost identificate diferențe semnificative în morfologie-anatomie (Iakimenko și Vorontsov, 1980, 1982) și mici diferențe în frecvența variantelor electroforezelor proteinice (Lyapunova și colab., 1980).

Experimentele de hibridare efectuate în vivariu au arătat existența doar a izolărilor reproductive parțiale, între diferitele variante cromozomale de

E. talpinus, ceea ce confirmă posibilitatea originii hibride a translocației robertsoniene. Toate aceste date atrag atenția asupra recentei diferențieri cromozomale în interiorul speciei *E. talpinus* (Lyapunova și Iakimenko, 1980; Lyapunova și colab., 1980). Probabil, în prezent, în regiunea Pamir-Altai decurge un proces intens de formare a speciilor, început cu reorganizarea cromozomilor (Vorontsov, 1980).

Înainte de a trece la studiul cineticii reasocierii ADN la cârtița cu diferite forme cromozomale, era necesar a se verifica dacă nu prezintă oare diferențe intraspecifice în caracteristicile cinetice ale ADN, un fenomen obișnuit pentru mamifere, cu atât mai mult cu cât asemenea exemple sunt prezente în literatură. Astfel, Antonov și colaboratorii, în studiul cineticii reasocierii ADN la șoarecii de câmp (genul *Microtus*) au identificat mai multe diferențe în cadrul subspeciilor *M. oeconomus*, decât între subspecia *M. oeconomus* și *M. arvalis* (Antonov, 1973, Vladichenscaya și colab., 1974). Pentru rezolvarea acestei probleme s-a comparat cinetica reasocierii ADN la animalele strâns înrudite, identice din punct de vedere cariologic. Au fost studiați: 1) reprezentanții diferitelor populații ale aceleiași specii - *Callorhinus ursinus* (pisica de mare nordică), de pe insula Mednii (Comandori) și insula Tiuleni (Sahalin); popândăul cu coadă lungă - *Citellus undulatus* din regiunea Citin și Irkutsc (subspecia *C.u.undulatus*); popândăul arctic - *C. parryi*, din diferite puncte ale regiuni Magadan (subspecia *C.p.tschukt schorum*); 2) diferite subspecii de popândău cu coadă lungă - *C.undulatus* - *C.u.undulatus*, *C.u.eversmanni* și *C.u.menzbiery*, popândăul arctic - *C.parryi* - *C.p.janensis*, *C.p.tschuktschorum*; 3) diferite specii de cârtiță, dar foarte asemănătoare între ele, având caracteristici comune, încât statutul lor de specie nu este bine stabilit precum este cazul *Margmota sibirica* și *M. baibacina*.

Dacă ar fi fost identificate diferențe în ADN la aceste nivele taxonomice destul de scăzute, la o asemănare cariologica mare, atunci semnificația cercetării formelor cromozomale diferite de la o specie, în scopul studierii mecanismelor restructurărilor cromozomale în evoluție, prin metoda reasocierii ADN, ar fi fost mult scazută. Însă, aceasta nu s-a întâmplat. Rezultatele tuturor celor 3 serii de experimente au arătat că, în limitele erorii de experiment de 1,5 - 2,5% (la o probabilitate de 95%), curbele cineticii reasocierii la animalele comparate au coincis.

Astfel, studiile asupra structurii genomului pinipedelor și rozătoarelor, la nivelul diferențelor intraspecifice, au arătat că asemenea diferențe nu au fost identificate. Prin urmare, divergența intraspecifică, din punct de vedere al structurii moleculare a genomului, cel mai probabil, nu reprezintă un eveniment frecvent la mamifere. Astfel, în acest caz, se poate presupune că, dacă ar fi fost identificate diferențe în structura genomului la cârtița cu forme cromozomale diferite, atunci ele ar fi putut fi atribuite numai restructurărilor cromozomale.

S-a studiat cinetica reasocierii de fragmente scurte de ADN (0,35 Kb) provenite de la două forme cromozomale diferite, la *Ellobius talpinus* cu 2n=34 și 2n=45 și a ADN de *E. lutescens*, cu 2n=17.

Curbele cineticii reasocierii fragmentelor ADN de la *E. talpinus*, cu 2n=34 și 2n=54, au coincis total. La evaluarea datelor experimentale, după metoda pătratelor, cea mai bună concordanță se obține, dacă se presupune existența a 4 fracții cinetice: care se reasociază foarte rapid ($C_0t < 10^{-2}$), care se reasociază rapid ($C_0t_{1/2}$=0,5, repetabilitate 6000), intermediară ($C_0t_{1/2}$=40, repetabilitate 80) și reasociere lentă ($C_0t_{1/2}$=3100, fracție nerepetitivă).

În experimentul cinetic, împreună cu ADN de cârtiță în calitate de standard, s-a studiat ADN de șobolan alb – *Rattus norvegicus*. Acesta a permis aprecierea mărimii genomului de cârtiță, pe calea comparării valorilor $C_0t_{1/2}$ ale fracțiilor unice de ADN. S-a constatat că mărimea genomului ambelor forme ar fi egală la *E. talpinus* - cu mărimea genomului de șobolan, iar la *E. lutescens* – puțin mai mic. Întrucât mărimea genomului la șobolan, conform datelor lui Bachmann (1972) este egal cu 4 pg (1C), atunci genomul la *E. talpinus* este, de asemenea, egal cu 4 pg, iar genomul la *E. lutescens* are 3,7 pg. Aceste valori sunt foarte apropiate de cele obținute prin metoda citofotometriei ADN (Lyanunova și colab., 1979). La compararea mărimilor absolute ale fracțiilor cinetice de ADN de cârtiță, se vede că *E. lutescens* conține mai puține secvențe unice (2,06, față de 2, 45 pg, la *E. talpinus*) la aceeași cantitate de repetiții.

Scăderea sau creșterea numărului de cromozomi față de numărul neschimbat al brațelor sale – este un fenomen destul de răspândit în evoluția speciilor înrudite. În majoritatea cazurilor, acest proces, prima dată descris de Robertson, în anul 1916, abordează un număr nu prea mare de cromozomi și doar în formele de translocație robertsoniană se urmărește un număr considerabil mai mare de restructurări. La *E. talpinus*, la trecerea de la cariotipul cu 54 cromozomi, la cariotipul de 34 de cromozomi, au fost implicați în translocație 40 de cromozomi, adică 20 de perechi de cromozomi. Referitor la mecanismul translocațiilor robertsoniene există câteva ipoteze (Navashin 1957, White și colab., 1957). Indiferent de mecanismul de fuziune a 2 cromozomi acrocentrici, cu formarea de metacentrici, la cârtiță, acest proces poate avea loc cu sau fără pierderea unei părți din cromozomi.

Suprapunerea curbelor cineticii reasocierii ADN de cârtiță cu 34 și 54 cromozomi demonstrează că, probabil, la *E. talpinus* nu s-a produs nici un fel de schimbare considerabilă în cantitatea de ADN total, sau în grupe separate de secvențe, în cazul fuziunilor robertsoniene ale cromozomilor.

Trecerea de la cariotipul ancestral acrocentric, cu 54 de cromozomi, de la *E. talpinus* cu forme cromozomale cu număr mare de cromozomi, la cariotipul de 17 cromozomi, de la *E. lutescens*, nu se putea produce doar pe baza tipului de restructurări robertsoniene. Fuziunile robertsoniene puteau da o formă ipotetică cu 2n=28, iar scăderea ulterioară a numărului de cromozomi până la 2n=17 trebuia să se fi produs pe calea fuziunilor tandemice ale cromozomilor, cu eliminarea unuia dintre centromeri, incluzând ADN pericentromeric adiacent. Heterocromatina pericentromerică, la multe specii eucariote, este îmbogățită mai ales cu secvențe ADN înalt repetitive, de aceea la genul *Ellobus* cu cariotip variat de cromozomi se așteptau diferențe în conținut, în primul rând a secvențelor ce se reasociază rapid. Însă, conținutul relativ al secvențelor reasociabile la valorile C_0t mai mici de 100, la *E. lutescens* nu este mai mic, ci, dimpotrivă, acesta este mai mare decât la *E. talpinus*. Însă, după conținutul relativ, cantitatea secvențelor repetitive la toți reprezentanții genului *Ellobius* este aceeași, iar cantitatea secvențelor unice (sau foarte puțin repetitive) la *E. lutescens* este mai mică cu aproximativ 0,4 pg (cam 10%).

Un caz și mai paradoxal al polimorfismului cromozomal a fost identificat de Wursten și Benischke (1970) la cerbii-muntiac. Muntiacul chinezesc – *Muntiacus reevesi*, ce populează China de Est și Taiwan, are 46 cromozomi în cariotip, iar muntiacul indian – *Muntiacus muntjak*, ce populează India, țările Indochinei și Indoneziei, are numai 6 cromozomi (femelele) sau 7 cromozomi (masculii) în cariotip (2n). Mărimea genomului la muntiacul indian este cu 20-30% mai mică decât la cel chinezesc (Wurster, Atkin 1972; Matthey 1873). Studiile cineticii reasocierii ADN acestor specii, efectuate de Schmidtke și colaboratori (1981), au arătat ca la *M. muntjak* există mult mai puține repetiții intermediare, decât la *M. reevesi*, atât după conținutul relativ, cât și după conținutul absolut. Conținutul secvențelor unice însă, precum și acela al secvențelor înalt repetitive (și/sau ale repetițiilor tandemice) este aproape același.

Astfel, în baza rezultatelor acestor cercetări se poate concluziona, că schimbările intraspecifice în numărul de cromozomi și în morfologia lor, prin rearanjamente de tip robertsonian, nu sunt însoțite de schimbarea structurii genomice, în timp ce fuziunile tandemice necentrice ale cromozomilor sunt însoțite de pierderea ADN, pierdere care implică mai ales secvențele puțin repetitive sau secvențele unice.

O instabilitate morfologică a cromozomilor și a cariotipului a fost remarcată și la *Elyomis quercinus*. Astfel, s-a stabilit că numărul de cromozomi este variabil, de la 48 la 54, iar NF variază între 82-88 (Delibes și colab., 1980).

Zima și colaboratorii (1984) a studiat cariotipul la *Elyomis quercinus* în Europa, evidențiind variabilitatea acestuia. El a remarcat, totodată, faptul că există o corelație directă între numărul de cromozomi și locul de origine a specimenelor capturate: la specimenele capturate în regiunile de câmpie numărul de cromozomi este mai mic față de cele capturate în zonele alpine.

Un aspect interesant legat de heterocromatina constitutivă este prezenta la nivelul acestuia a unor blocuri heterocromatinice duble, separate spațial, la nivelul perechilor 1 și 12. Autorii (Murariu și colab., 1985) interpretează acest aspect în termenii existenței unor fuziuni cetromerice recente. Aceste mecanisme pot să explice existența unui polimorfism cromozomal, ce caracterizează din punct de vedere citogenetic această specie, care este exprimat prin diferențe în numărul și morfologia cromozomilor acestei specii, în distribuția acesteia.

Este cunoscut faptul că fenomenul de fuziune robertsoniană menține inițial ambele blocuri de heterocromatină apartenente celor doi centromeri participanți în fuziune, pentru ca ulterior, să aibă loc o fuziune propriu-zisă a celor două blocuri de heterocromatină, respectiv centromeri, sau a unuia dintre aceștia.

1.2. GENUL *CITELLUS (SCIURIDAE)* - SPECII CE SE CARACTERIZEAZĂ PRIN DIFERENȚE ÎN STRUCTURA FINĂ A CROMOZOMILOR

Dacă schimbările numărului și morfologiei cromozomilor, cel puțin, de tip robertsonian, nu sunt însoțite de schimbări în structura genomului, atunci apare întrebarea: vor fi oare găsite diferențe în structura genomului, și dacă da, atunci care este natura lor la speciile înrudite, ce au diferențe foarte mici în numărul și morfologia cromozomilor (la colorare obișnuită), dar care diferă după cantitatea heterocromatinei constitutive? Sub acest aspect, s-a studiat cinetica reasocierii fragmentelor scurte de ADN la specii de popândăi.

Pentru popândăi, vârsta geologică a divergenței, în ani, coincide cu numărul de generații (Vorontsov și colab., 1980). Istoria geologică a popândăilor este bine cunoscută (Gromov și colab., 1965). În interiorul genului *Citellus* există forme ce se situează la diferite etape de evoluție - de la subspecii la specii tipice sau specii „bune" (Vorontsov și colab., 1980). Toate aceste calități fac din genul *Citellus* nu numai un caz interesant, dar și un obiect potrivit pentru cercetările evoliționiste și mai ales cele de genetică moleculară. În legătură cu aceasta, este necesar să subliniem că în genetica moleculară, ca și în oricare altă nouă direcție de cercetare, un loc deosebit îl ocupă lucrările de cercetare a speciilor strâns înrudite, bine studiate din diferite puncte de vedere. În acest caz, rezultatele obținute la nivel molecular, pot fi oricând corelate cu aspecte cunoscute ale divergenței fenotipice ale speciilor, ceea ce deja este de la sine important, având în vedere absența teoriei funcționale în formarea speciilor.

Popândăii din genul *Citellus* sunt larg răspândiți în pajiștile de șes și de munte, pajiștile de pădure și în zonele stepelor de tundră ale Euroasiei și ale Americii de Nord. Acest gen, conform datelor lui Gromov și colaboratorii (1965), cuprinde 20 de specii actuale (dintre care 12, în fauna Rusiei) și include 3 subgenuri: subgenul popândăilor cu coadă lungă *Urocitellus* (3 specii), subgenul popândăilor autentici *Citellus sensu stricto* (14 specii) și subgenul popândăilor de deșert-stepă *Colobotis* (3 specii). Reprezentantul subgenului *Citellus*, *C. relictus*, după părerea lui Gromov, îmbină particularitățile subgenurilor *Citellus* și *Urocitellus*. Alt reprezentant al subgenului *Citellus* - popândăul mic *C. pigmaeus*, după mai multe caracteristici, ocupă o poziție intermediară între subgenurile *Citellus* și *Colobotis*. Pentru genul

Citellus au fost efectuate cercetări cariologice vaste (Nadler, 1966) care au demonstrat diversitatea citogenetică a genului. Numărul cromozomilor la *Citellus* variază de la 2n=30 la 2n=46, iar cea mai mare parte o constituie speciile cu 2n=36. După părerea lui Vorontsov și Lyapunova (1970), cei mai vechi dintre reprezentanții genului sunt speciile cu număr mare de cromozomi (*C. citellus* 2n=40, *C. xanthoprymnus* 2n=42; *C. vigilis*, 2n=46), iar cele mai tinere – speciile cu număr mic de cromozomi (*C. undulatus* 2n=32; *C. parryi* 2n=34). Pentru unele specii de popândăi au fost cercetate modelele de bandare ale cromozomilor. S-a arătat că, cromozomii acestor specii de popândăi au multe în comun în distribuția benzilor G (Lyapunova și colab., 1978) și în același timp variază considerabil din punct de vedere al conținutului relativ și al distribuției benzilor C (de la 20 la 32%) (Lyapunova 1978, 1980).

S-a studiat structura genomului la 8 tipuri de popândăi, din cele 3 subgenuri: *C.* (*Urocitellus*) *undulatus* (2n=32), *C.* (*Urocitellus*) *parryi* (2n=34), *C.* (*Citellus*) *relictus* (2n=36), *C.* (*Citellus*) *dauricus* (2n=36), *C.* (*Citellus*) *pygmaeus* (2n=36), *C.* (*Citellus*) *citellus* (2n=40), *C.* (*Colobotis*) *fulvus* (2n=36) și *C.* (*Colobotis*) *major* (2n=36).

Cinetica reasocierii fragmentelor scurte de ADN pentru toate speciile a fost obținută în condiții identice, cu utilizarea a 2-5 probe paralele, la fiecare valoare C_0t. În experimentul paralel, în aceleași condiții, era măsurată cinetica reasocierii ADN de *E.coli*, a fragmentelor cu o lungime de 0,3 Kb (Ginatuline și colab, 1982). Valoarea medie la patrat a devierii curbei din punctele experimentale, în majoritatea cazurilor, nu era mai mare de 2,5%. În ADN popândăilor ies în evidență 4 fracții cinetice: care se reasociază foarte rapid ($C_0t<10^{-3}$), care se reasociază moderat de rapid (C_0t 10^{-3} – $6x10^{-1}$), intermediară (C_0t 6×10^{-1} – 6×10^{1}) și care se reasociază lent ($C_0t >$ 6×10^{-1}).

Fracțiile cinetice de ADN, cu același nume de la diferite specii, coincid între ele, după viteza de reasociere si, respectiv, după frecvența repetabilității dar, în același timp, diferă după conținutul relativ din genom. Aproximativ jumătate din genomul de *Citellus* – este reprezentat de succesiunile fracției lente, a căror frecvență de repetabilitate este egală cu zero. Mult mai variabilă, după conținutul relativ în genom, este fracția foarte rapidă, care variază între 6 și 23%. Fracția ADN intermediară se caracterizează printr-o variabilitate mai mică, dar totuși detectabilă, de la 10 la 20% (repetabilitate

300-400). Cu o foarte mică variabilitate se caracterizează proporția fracției rapide (repetabilitate 40-80 mii) – între 12-14,5%. Proporția fracției unice se schimbă de la 47 la 67%, iar valoarea sa $C_0t_{1/2}$ – de la 1600 la 2500. Diferențele în viteza de reasociere a acestei fracții sunt condiționate, pe de o parte, de diferențele în mărimea fragmentelor ADN luate în studiu (0,25-0,42 Kb), iar pe de altă parte, de diferențele posibile în mărimea genomică a acestor specii. Compararea parametrilor cinetici de ADN, la speciile din diferite subgenuri, arată că structura moleculară a genomului este destul de asemănătoare la reprezentanții subgenului *Urocitellus* (*C. undulatus* și *C. parryi*) și mult mai asemănătoare la reprezentanții subgenului *Colobotis* (*C. major* și *C. fulvus*). În genomul acestor specii identificarea diferențelor mai mari, în limitele de 4-5%, se referă, în principal, la proporția secvențelor ADN care se reasociază foarte rapid. În interiorul subgenului *Citellus sensu stricto*, caracteristicile structurii moleculare a genomului variază considerabil. La reprezentanții studiați ai acestui subgen se observă extinderea totală a variabilitații parametrilor cinetici ai ADN, care a fost identificată la genul *Citellus*. Împreună cu ADN de la popândăi, în condiții identice, a fost măsurată cinetica reasocierii fragmentelor ADN de *E.coli*, cu lungimea de 300 pb. În condițiile date ale experimentului, valoarea $C_0t_{1/2}$ a ADN de *E. coli* era egală cu 3. Deoarece lungimea fragmentelor ADN la diferite specii era diferită, valorile $C_0t_{1/2}$ ale fracției unice de ADN, utilizate la calcularea dimensiunii genomului lor, erau corectate în prealabil către valorile $C_0t_{1/2}$, la lungimea fragmentelor de 300 pb, prin utilizarea raportului dintre viteza de reasociere și lungimea fragmentelor (Wetmur; Davidson, 1968).

Dimensiunile genomice la *Citellus* variază pe o arie de la 2,72 pg, la *C. dauricus* până la 3,87 pg, la *C. pygmaeus* și *C. fulvus*.

Într-o altă masură, variază și complexitatea (conținutul absolut) fiecarei fracții cinetice. Calculele au indicat variații în cantitatea ADN din componența succesiunilor fracției foarte rapide de la 0,17 la 0,75 pg, iar în componenta altor fracții repetitive asemenea variații sunt în limite mai mici.Analiza statistică a datelor (fig. 1) a arătat, că, după cantitate, numai fracția intermediară nu se corelează deloc cu dimensiunea genomului (coeficientul de corelație r=-0,15). Cea mai bună corelație cu dimensiunea genomului s-a constatat în secvențele fracției cu reasociere rapidă (r=0,92). Puțin mai mică, o astfel de legătură există la secvențele fracției foarte rapide (r=0,51) datorită abaterii punctului care aparține lui *C. dauricus*. Fără considerarea acestui punct, adică pentru toate celelalte specii de popândăi, variația conținutului fracției foarte rapide se corelează foarte bine cu variația dimensiunii genomice (r=0,86). Bine se corelează cu dimensiunea genomului și cantitatea secvențelor unice (r=0,87). Caracteristic la *C. dauricus* este faptul că, această specie, care are cea mai mică dimensiune genomică, conține o cantitate destul de mare de secvențe ce se reasociază foarte rapid și, totodată, o cantitate de 1,5-2 ori mai mică decât celelalte tipuri de secvențe unice.

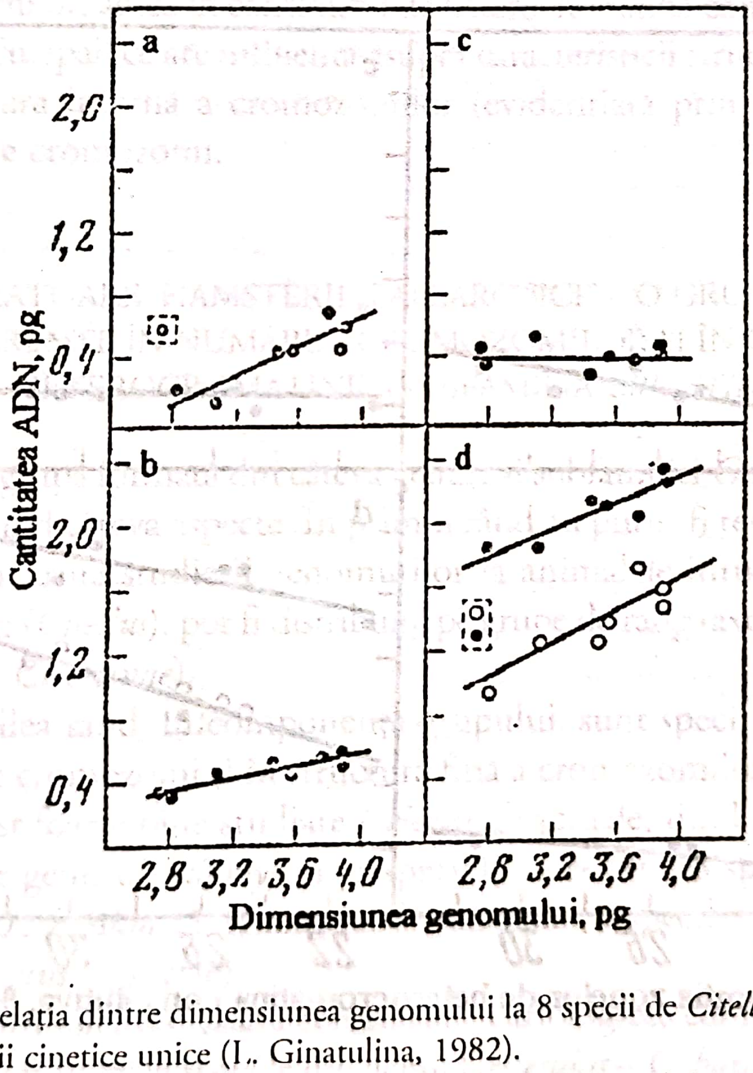


Fig. 1 — Corelația dintre dimensiunea genomului la 8 specii de *Citellus* și cantitatea de ADN în fracții cinetice unice (I.. Ginatulina, 1982).
a - fracția ce se reasociază foarte rapid ($C_0t = 10^{-3}$), coeficientul de corelație r = 0,51; b - fracția ce se reasociază rapid ($C_0t_{1/2}$ = 0,03-0,06; r = 0.92); c – fracția intermediară ($C_0t_{1/2}$ = 6; r = -0,15); d – fracția unică ($C_0t > 6 \times 10^1$; r = 0,87) și fracția totală a repetițiilor (prezentată cu cerculețe albe) ($C_0t < 6 \times 10^1$; r = 0,68)

Pentru 7 din 8 specii de popândăi studiați (cu excepția speciei *C.citellus*) de către Lyapunova și Korablev, s-a efectuat măsurarea conținutului relativ de heterocromatină constitutivă. S-a arătat că, proporția de heterocromatină din cariotipul de *Citellus* variază de la 20,8%, la *C. undulatus*, până la 31,4%, la *C. fulvus*. Zona cromozomală bandată C se corelează foarte bine cu dimensiunea genomului, la 6 specii de popândăi (excepție este *C. dauricus*) (fig. 2).

La genul *Citellus*, cantitatea generală de repetiții se corelează mai bine cu conținutul de heterocromatină. Fracția rapidă și cea foarte rapidă formează o legatură lineară cantitativă cu heterocromatina, pe când fractia

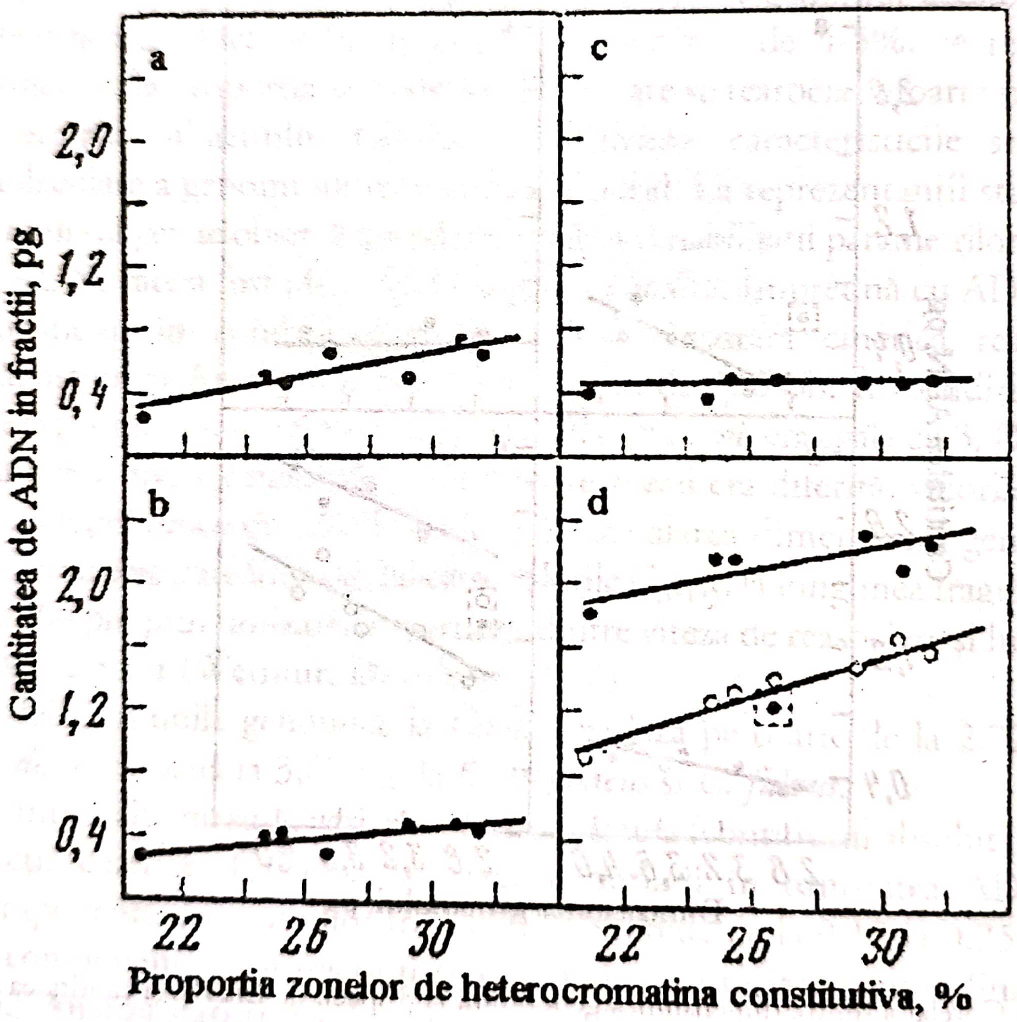


Fig. 2 — Relația dintre cantitatea de ADN în fracții cinetice individuale și procentul de heterocromatină în cromozomii a 7 specii de *Citellus* (I.. Ginatulina, 1982).
a - fracția ce se reasociază foarte rapid, b – fracția ce se reasociază rapid, c - fracția intermediară, d - fracția sumară de repetiții (reprezentată cu cerculețe albe) și fracția unică.

intermediară nu se corelează cu conținutul de heterocromatină. Este interesant de constatat că *C. dauricus*, se diferențiază foarte mult de alte specii, prin conținutul scăzut de secvențe unice în genom, în același timp se caracterizează printr-o concordanță calitativă foarte bună între ADN repetitiv și heterocromatina cromozomală. Deci, există un conținut scăzut de secvențe unice.

Studiile au arătat că structura genomică la speciile înrudite, ale aceluiași gen, se deosebesc din punct de vedere cantitativ, rămânând uniforme din punct de vedere calitativ. Se deosebește și complexitatea (dimensiunea) genomurilor. Variațiile observate se corelează cu variațiile în structura fină a cromozomilor, adică în conținutul de heterocromatină constitutivă. Astfel, factorul principal, ce are influență asupra caracteristicii structurii genomice, este structura internă a cromozomilor (evidențiată prin bandare C) nu numărul de cromozomi.

1.3. ROZĂTOARE: HAMSTERII „PALEARCTICI” – O GRUPĂ DE SPECII CU DIFERENȚE ÎN NUMĂRUL CROMOZOMILOR ȘI ÎN CANTITATEA HETEROCROMATINEI (SUBFAMILIA *CRICETINAE*)

Această grupă formată din câteva genuri ai subfamiliei *Cricetinae* prezintă interes privind câteva aspecte. În primul rând au putut fi testate concluziile obținute în urma studierii genomurilor la animalele înrudite din cadrul aceluiasi gen (*Citellus*), pot fi distribuite pe grupe de rang taxonomic superior (subfamilia *Cricetinae*).

În al doilea rând, în componența grupului, sunt specii cu diferențe în numărul de cromozomi și în structura fină a cromozomilor. Și în al treilea rând, au fost foarte bine studiate *Cricetinele* actuale, fiind reprezentate de următoarele genuri: *Calomysens* (1 specie), *Cricetulus* (8 specii), *Phodopus* (2 specii), *Tscherskia* (1 specie), *Allocricetulus* (2 specii), *Mesocricetus* (4 specii), *Cricetus* (1 specie).

În conformitate cu datele cercetărilor cariologice, cel mai mic număr de cromozomi există la speciile din genul *Cricetulus* – *C. barabensis* (2n=20), *C. griseus* (2n=22), *C. migratorius* (2n=22) și genul *Cricetus* – *C. cricetus* (2n=22). În cariotipul de *Tscherskia triton*, sunt în totalitate 28-30 cromozomi acrocentrici. Reprezentanții genului *Phodopus* se deosebesc din punct de vedere cariologic de grupa *Cricetus – Cricetulus* (*P. sungorus*, 2n=28 și *P. roborovskii*, 2n=34). Toate speciile genului *Mesocricetus* au un număr mare de cromozomi, dublu decât la *Cricetus* și *Cricetulus* (*M. auratus*, 2n=44, *M. raddei*, 2n=42-44, *M. brandti*, 2n=42 și *M. newtoni*, 2n=38) (Matthey, 1973). După imaginea benzilor G, cromozomii de *Cricetus cricetus* se aseamănă foarte mult cu cromozomii de la *C. griseus*, *C. migratorius* și *C. barabensis*, pe când la cromozomii reprezentanților altor genuri, o astfel de asemănare n-a fost observată. Numai la *T. triton* segmentele separate de cromozomi identifică asemănarea cu cromozomii primei grupe. Studiul cariotipurilor bandate C a evidențiat diferențe fundamentale în cantitatea și distribuția heterocromatinei. *Cricetus cricetus* și *Mesocricetus auratus* dispun de o mare cantitate asemănătoare de heterocromatină (~34%), dar dacă la prima specie, în cromozomi, se identifică blocuri mari de heterocromatină pericentromerică, la cea de a doua specie, heterocromatina, în mare parte, este distribuită pe brațele cromozomilor.

La *Cricetului griseus*, sectoarele heterocromatinice constituie 25% din cariotip, de aceea, regiunile pericentromerice, la majoritatea cromozomilor, nu se colorează prin bandare C. O cantitate și mai mică de heterocromatină există în cromozomii de *Phodopus sungorus* (15%) și *Cricetulus barabensis*. La *Tscherskia triton*, în regiunile pericentromerice ale cromozomilor, se află o cantitate foarte mare de heterocromatină (~32%).

În cele din urmă, o analiză electroforetică a polimorfismului proteinic a arătat apropierea lui *Cricetus cricetus* de *Cricetulus* și o oarecare asemănare cu *T. triton*, *M. auratus* și *P. sungorus*.

La hamsterii „palearctici" a fost bine studiată morfologia, cariologia și legăturile de înrudire. Printre aceștia, există specii cu o morfologie asemănătoare și același număr de cromozomi și specii cu diferențe cromozomale mari. Hamsterii se caracterizează printr-o diversitate mare în cantitatea și distribuția heterocromatinei constitutive.

Structura genomului la 5 specii de hamsteri (*C. barabensis*, 2n=20; *C. migratorius*, 2n=22; *Cricetus cricetus*, 2n=22; *T. triton*, 2n=28-30 și *M. auratus*, 2n=44) a fost caracterizată prin metoda reasocierii fragmentelor scurte de ADN, cu lungime medie de 0,25-0,40 Kb. Cinetica reasocierii ADN a fost obținută printr-o serie de experimente, în condiții absolut identice, folosind la aceeași valoare C_0t 4-5 probe paralele din preparatele de ADN ale fiecărei specii.

La hamsteri, ca și la popândăi, au fost obținute 4 fracții cinetice de ADN: fracția ce se reasociază foarte rapid, fracția ce se reasociază moderat de rapid, fracția intermediară și fracția ce se reasociază lent. Conținutul relativ al fracției ce se reasociază foarte rapid, în genomul de hamster, cu excepția *T. triton*, este mic - 3-6%. În genomul de *T. triton*, proporția acestei fracții ajunge la 13% (2n=28) și 16% (2n=30). În componența acestei fracții pot intra repetiții tandemice ce se reasociază instantaneu și secvențe înalt repetitive. Cercetarea detaliată a cineticii reasocierii ADN la *T. triton* și la *C. barabensis*, în domeniul valorilor C_0t foarte scăzute, a arătat că fracția foarte rapidă este constituită, în principal, din repetiții inversate. Proporția fracției ce se reasociază moderat de rapid este mai mică, la *C. barabensis* (9,6%) și nu se deosebește la celelalte specii, constituind 11-13%. Frecvența repetabilității acestei fracții variază la diferite specii, de la 20 la 80 mii. Conținutul fracției intermediare variază în limite mari. La 3 specii – *C. migratorius*, *M. auratus* și *Cricetus cricetus* - această fracție cuprinde aproape ¼ din genom (22-24%), la *C. barabensis* – mai putin (18%), la *T. triton* și mai putin (13-16%). Secvențele acestei fracții se repetă de 125-310, ori în genom. Cea mai mare fracție ADN – este fracția ce se reasociază lent. Această fracție include, în general, succesiuni unice. Conținutul relativ al fracției ce se reasociază lent, în genomul de *C. barabensis*, cuprinde 70%, iar în genomul altor specii – 57-62%.

Calculele au arătat că dimensiunea genomului la *Cricetus* este aproape de 2 ori mai mică decât la *M. auratus* (1C) (2,5 pg și respectiv 4,8 pg). La două specii de *Cricetulus*, s-a identificat o valoare asemănătoare a dimensiunii genomului, egală cu 3pg. La *T. triton*, mărimea genomului este cu 30% mai mare decât la *Cricetulus*, dar mai mică decât la *M. auratus* (3,8-3,9 pg). Astfel, după datele cineticii reasocierii ADN, reprezentanții diferitor genuri se deosebesc, după cantitatea ADN în genom, de 1,2-1,9 ori.

Pentru a stabili pe baza căror secvențe se diferențiază dimensiunea genomurilor la hamster, s-a calculat cantitatea ADN în genomul fiecărei specii, față de cantitatea ADN în cadrul repetițiilor și în cadrul fracțiilor unice. Între valorile comparabile, există o dependență lineară (fig.3). Deci, atât cantitatea repetițiilor, cât și cantitatea secvențelor unice cresc proportional cu creșterea dimensiunii genomului. Dacă se calculează conținutul ADN în fracții separate, se constată că mărimea acestuia crește paralel cu creșterea dimensiunii genomului, la toate speciile, cu excepția

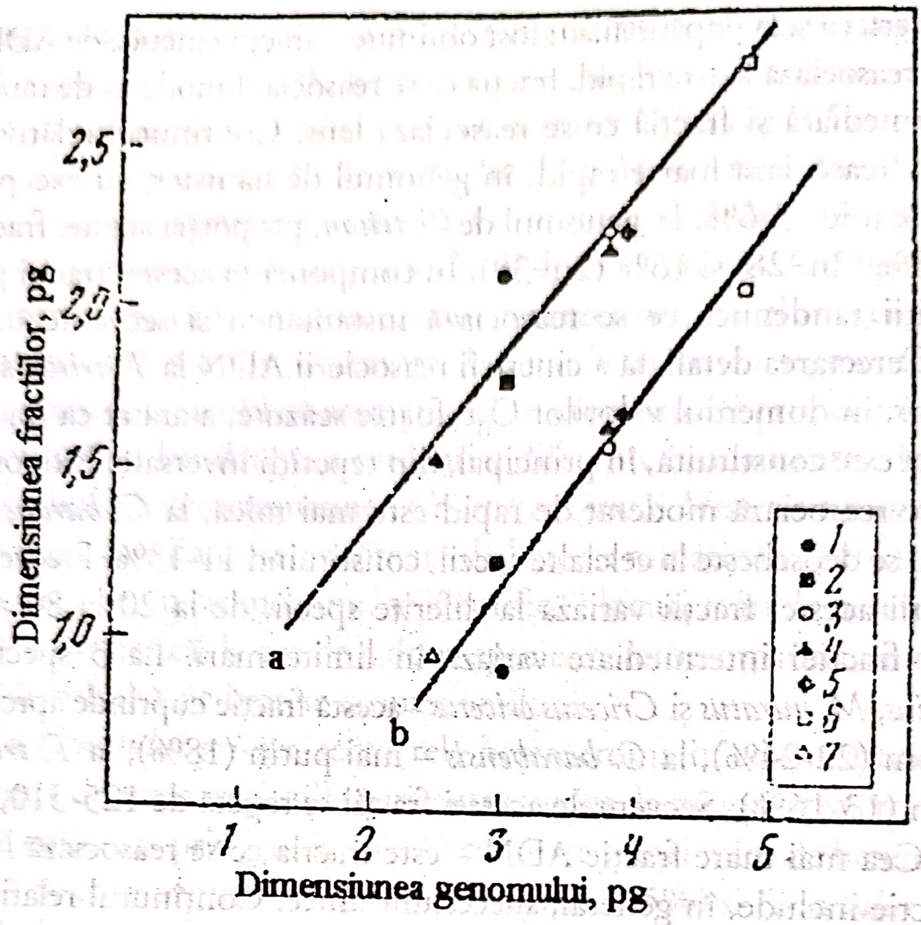


Fig. 3— Corelația dintre dimensiunea genomului și cantitatea ADN din repetiții (a) și succesiunile unice (b) la *Cricetinae* (A. Ginatulin, 1984).
1 - *C. barabensis*; 2 - *C. migratorius*; 3 - *T. triton* (2n = 28); 4 - *T. triton* (2n = 30); 5 - *T. triton* (2n = 30); 6 - *M. auratus*; 7 - *Cricetus cricetus*.

speciei *T. triton*. La acesta există un conținut anormal de mare (pentru speciile luate în studiu) de secvențe ce se reasociază foarte rapid și, în același timp, un conținut scăzut de repetiții intermediare, în comparație cu același conținut de la speciile cu dimensiune mică a genomului – *C. barabensis* și *Cricetus*.

Hamsterii cu număr mic de cromozomi (*Cricetulus* și *Cricetus*) au, în general, cel mai mic genom, un conținut mai mic (complexitate) de repetiții și secvențe unice, decât cei cu număr mare de cromozomi. Complexitatea repetițiilor fracțiilor separate nu depinde de numărul de cromozomi. Pentru cele 3 specii (*M. auratus*, *T. triton* și *C. barabensis*) conținutul relativ de heterocromatină se corelează cu cantitatea ADN din conținutul repetițiilor totale și a succesiunilor unice și respectiv cu dimensiunea întregului genom. Hamsterul obișnuit, *Cricetus cricetus*, ocupă o poziție deosebită în acest sens: nici dimensiunea fiecărei fracții, nici dimensiunea întregului genom nu se corelează cu conținutul mare de heterocromatină, evidențiată la această specie. La *M. auratus*, conținutului mai mare de heterocromatină îi corespunde conținutul crescut al tuturor fracțiilor, iar la *T. triton* – numai a fracției rapide și foarte rapide.

Rezultatele cercetărilor genomului la hamsterii ce aparțin diferitor genuri ale aceleiași subfamilii, se deosebesc de rezultatele obținute pentru speciile mai apropiate filogenetic. Dacă la popândăi, conținutului crescut de heterocromatină îi corespunde o proporție crescută de fracții cu reasociere foarte rapidă și rapidă, la hamsteri, o astfel de corelație s-a observat numai pentru *T. triton*. La *M. auratus* și *Cricetus*, la același conținut mare de heterocromatina (34% fiecare), dar și la o proporție asemănătoare de secvențe ale fracțiilor repetitive din genom, dimensiunile genomurilor se dosebesc de 2 ori, și, ca urmare, se deosebesc dimensiunile absolute ale fiecărui component repetitiv. Spre deosebire de popândăi, la hamsteri, numărul cromozomilor se corelează destul de bine cu dimensiunea genomului: specii cu număr mic de cromozomi au dimensiunea cea mai mică (2,5-3 pg: *C. barabensis* cu 2n=20, *C. migratorius* și *Cricetus*, ambii cu 2n=22), număr intermediar de cromozomi și valoare intermediară a dimensiunii genomului are *T. triton* (3,8-3,9 pg și 2n=28-30), iar specia cu număr mare de cromozomi *M. auratus* are și dimensiunea cea mai mare a genomului (4,8 pg și 2n=44).

Această corelație este, însă, discutabilă, întrucât aceste specii sunt destul de îndepărtate fologenetic una de cealaltă și nu este exclusă posibilitatea că a fost identificată o coincidență întâmplătoare și că în evoluția hamsterilor, divergența, din punct de vedere al numărului de cromozomi, a mers independent de divergența din punct de vedere al dimensiunii genomului.

1.4. MAMIFERELE MARINE (CETACEE ȘI PINIPEDE) - GRUPE CU VITEZA MICA DE EVOLUȚIE CARIOTIPICĂ

Rezultatele cercetărilor ADN la primate și rozătoare au arătat că structura genomului la speciile acestor ordine este destul de variabilă. Polimorfismele, după conținutul relativ al diferitor fracții ADN, au fost evidențiate atât între genuri (popândăi și unii hamsteri), cât și în cadrul aceluiași gen (hamsteri). Au fost identificate diferențe remarcabile în dimensiunile genomurilor la rozătoare. Diferențe mult mai mari la reprezentanții acestui ordin sunt observate în modul organizării moleculare a genomurilor lor.

O cauză mai verosimilă a variabilitații genomului la rozătoare poate fi viteza mare de evoluție a ordinului, în general, care a condus și la o variabilitate morfologică și cariologică mare. În sprijinul acestei interpretări, vin rezultatele cercetărilor genomului primatelor, care se caracterizează prin viteză de evoluție morfologică și cariotipică mare și demonstrează variabilitatea mare din punct de vedere al structurii moleculare a genomului.

După părerea multor autori (Wilson și colab., 1975; Such și colab., 1977; Bengtsson 1980; Vorontsov, 1980) ritmul formării speciilor, în multe ordine de mamifere, se află în legatură directă cu ritmul variației numărului de cromozomi și numărul brațelor cromozomale. După datele lui Wilson și colaboratorii, viteza mică de evoluție pentru mamifere este evidențiată la cetaceae și marsupiale (este aproape de zero), mai mare – la insectivore, chiroptere, carnivore și foarte mare – la rozătoare, primate și copitate.

O viteză de evoluție comparabil mai mică, este caracteristică și pentru ordinul pinipedelor (Arnason, 1974; Anbinder, 1980). Dacă se pune la baza variabilității mari a caracteristicilor moleculare a genomului, observată la rozătoare și primate, viteza evolutivă mare a acestor ordine, atunci apare inevitabil întrebarea: stabilizarea cariotipică și procesul de încetinire a evoluției morfotipului, în grupele cu viteză evolutivă mica, nu este însoțită oare de stabilizarea și caracteristicile moleculare ale genomului?

Dovezile despre structura genomică a speciilor ce aparțin taxonilor cu viteză mică de evoluție sunt absente. De aceea, s-a considerat interesant de comparat cinetica reasocierii ADN la reprezentanții cetaceelor și pinipedelor, adică la grupele taxonomice destul de mari, ce se caracterizează printr-o viteză mică de evoluție a morfotipului și a cariotipului.

Morfotipul cetaceelor s-a format în primele etape ale divergenței lor și, ulterior, s-a schimbat foarte lent. În oligocen, cu 35-40 milioane de ani în urmă, existau deja reprezentanți ai unor familii de odontocete, iar 20 milioane de ani în urmă existau reprezentanți ai unor genuri incluse în aceste familii, ceea ce corespunde unui fenomen de evoluție lentă, fenomen neobișnuit pentru mamifere. Speciile asemănătoare rechinilor, în general, se caracterizează și printr-o stabilitate surprinzatoare și uniformitate cariotipică (2n=44, existând numai un mic număr de specii cu 2n=42). Trebuie de menționat și faptul că mysticetele (genul *Balaenoptera*) au 25-30% regiuni heterocromatice în cromozomi, iar odontocetele – 10-15%.

La cetacee, heterocromatina este localizată predominant interstițial și mult mai puțin în regiunile centromerice ale cromozomilor și coincide, după răspândire, cu regiunile de replicare târzie a cromozomilor.

Tot astfel, pinipedele, se caracterizează printr-o stabilitate înaltă și uniformitate pronunțată a cariotipurilor, ceea ce, după părerea lui Arnason (1974), la aceste mamifere, cariotipul s-a stabilizat la fel de devreme și foarte rapid, în primele etape ale istoriei lor, în perioada includerii grupei ancestrale în noul mediu de viață și adaptare primară la condiții acvatice.

Însă, pinipedele, spre deosebire de cetacee, au păstrat o legatură strânsă cu mediul terestru, specializarea la condițiile acvatice, în general, este exprimată mai puțin. În cadrul ordinului se întâlnesc 3 variante cromozomale: 2n=36, 2n=34 și 2n=32. După părerea lui Anbinder (1980), familiile actuale de pinipede au apărut de la un strămoș cu 36 de cromozomi, aproximativ acum 20 milioane de ani. Astfel, după 20 milioane de ani, numărul de cromozomi la pinipede s-a micșorat doar de la 2n=36 la 2n=32. După o perioadă mai mică (10-15 milioane de ani), numărul de cromozomi la primatele superioare a ajuns la o diversitate semnificativ mai mare: de la 2n=72, la unele specii de *Cercopithecus*, până la 2n=20 la *Callicebus torquatus*. La popândăi, variația de la 2n=46 până la 2n=32 a apărut după 5 milioane de ani (Vorontsov și Lyapunova, 1972).

Dacă stabilizarea morfologică și cariotipică este însoțită de stabilizarea structurii genomului, se poate aștepta să existe o suprapunere în caracteristicile cinetice ale ADN la cetacee, pe de o parte, și la pinipede – pe de altă parte.

S-a studiat cinetica reasocierii ADN la doi reprezentanți ai cetaceelor: *Physeter catodon* (2n=42, subordinul *Odontocetae*) și *Balaenoptera edeni* (2n=44, subordinul *Mysticeti*), dar și la 3 reprezentanți ai pinipedelor, din 2 familii: *Phoca largha* (2n=32, familia focilor adevarate - *Phocidae*), *Eumetopias jubatus* (2n=36) și *Callorhinus ursinus* (2n=36, ambele din familia focilor cu urechi - *Otariidae*).

Curbele cinetice ale reasocierii fragmentelor ADN cu o lungime medie de 300 pb au fost obținute în condiții de experimentare absolut identice (și în același timp cu ADN de la pinipede). La ambele tipuri au fost identificate 4 fracții cinetice (componente), ce se deosebesc după viteza de reasociere: fracția ce se reasociază foarte rapid sau fracția foarte rapidă ($C_0t<10^{-3}$), fracția ce se reasociază rapid sau fracția rapidă (C_0t 10^{-3} – 3 x 10^{-1}), fracția intermediară (C_0t 3 x 10^{-1} – 3 x 10^{2}) și fracția ce se reasociază lent sau fracția lentă (secvențe unice) ($C_0t > 10^{2}$). Profilele curbelor cinetice ale reasocierii ADN, la *Balaenoptera edeni* și *Physeter catodon* sunt foarte asemănătoare. Componentele cinetice ale ADN repetitiv de la aceste specii coincid în totalitate, după viteza de reasociere și doar 2-3% se deosebesc după conținutul genomic, și totuși, conținutul total al secvențelor repetitive, în ADN de *Balaenoptera edeni* și *Physeter catodon* este același și constituie aproximativ 32%. Dintre acestea, 10% reprezintă secvențele ce se reasociază foarte rapid (ce se repetă de 1 milion de ori), 7-10% - secvențe ce au în genom ~80 mii copii, și 12-15% - secvențe ce se repetă cel mai puțin (~800 copii). Restul de 68% din ADN, la cetaceele studiate, este constituit din secvențe unice, nerepetitive.

În experimentele paralele, s-a obținut curba cinetică a ADN de *E.coli* și s-a putut măsura dimensiunea genomului la cetacee conform dependenței existente între dimensiunea genomului și valoarea $C_0t_{1/2}$ a fracției unice. Valoarea $C_0t_{1/2}$ a fragmentelor reasociate de *E.coli*, în condițiile experimentului dat, este de 3,5 valoarea $C_0t_{1/2}$ a fracției ADN unice de la cetacee – este de 714 ori mai mare (2500). De aici, rezultă că dimensiunea genomului haploid la *Balaenoptera edeni* și *Physeter catodon* este de 3,3 pg.

Concluziile experimentului de cercetare a cineticii reasocierii ADN la 2 specii de cetacee:

a) la reprezentanții a două subordine de cetacee – *Odontocete* și *Mysticete* – se observă o uniformitate totală în structura moleculară a genomului; aceasta se corelează bine cu unicitatea și stabilitatea structurii cariotipice, la cetaceele studiate, și cu o viteză foarte mică de evoluție a speciilor.

b) Deși pentru *Mysticete* s-a arătat o îmbogățire considerabilă a cariotipului, în comparație cu materialul heterocromatinic, în cariotipul *Odontocetelor* nu s-au putut evidenția niște diferențe considerabile, în conținutul diferitor grupe de secvențe nucleotidice, în genomurile de *Physeter catodon* și *Balaenoptera edeni*.

c) S-a constatat că cinetica curbelor la pinipedele studiate este mai puțin asemănătoare decât la cetacee.

Astfel, variază toate caracteristicile structurii moleculare a genomului: proporția fracțiilor separate ale repetițiilor, proporția repetițiilor totale, nivelul de repetabilitate în genomul grupelor separate de secvențe și chiar dimesiunea genomului.

1.5. ASPECTE GENERALE PRIVIND STRUCTURA GENOMULUI LA MAMIFERE

Frecvența repetabilitații

În studiul cineticii reasocierii ADN la mamifere s-au evidențiat fracții ce se deosebesc după viteza de reasociere și frecvența repetițiilor din genom. Aceste fracții se referă: la o fracție de secvențe unice ce se reasociază lent și 3 fracții de repetiții: fracția cu o viteză foarte mare de reasociere – ce include secvențe înalt repetitive (>10^6 copii în genom) și secvențe palindromice; fracția cu viteză moderată de reasociere – conține secvențe

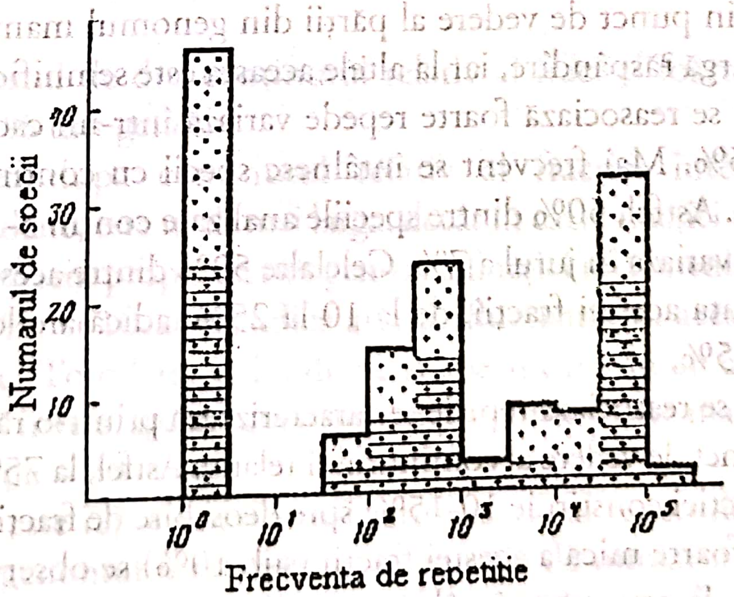


Fig. 4 — Histograma frecvențelor de repetiție a secvențelor ADN, la 50 de specii și subspecii de mamifere (A. Ginatulin, 1984)

ce se repetă de zeci de mii de ori și fracția cu o viteză de reasociere intermediară – secvențe ce se repetă de sute de ori în genom.

Imaginea grafică ce reprezintă caracterul de distribuție după frecvența de repetiție a secvențelor ADN în genomurile mamiferelor este dată în fig. 4, unde gradul de repetabilitate a secvențelor din diferite fracții ADN este dată în raport cu numărul de specii, în genomul cărora s-au evidențiat aceste fracții.

În figura 4 se arată că secvențele ADN în genomurile de mamifere nu se caracterizează printr-un spectru neîntrerupt al frecventelor de repetabilitate, postulate în alte lucrări (Britten, Kohne și colab., 1968), însă au o aranjare discretă a frecvențelor. Deși, la specii individuale poate să difere puțin, dar pentru marea majoritate a speciilor (85% din speciile studiate) de mamifere este caracteristic următorul set de frecvențe: 1; 10^2-10^3; 10^4-10^5. Numai la un număr nesemnificativ de specii s-au observat frecvențe intermediare de repetabilitate a secvențelor ADN: 10^1-10^2; 10^3-10^4 și peste 10^5.

Conținutul relativ de fracții în genom

În figura 5 se prezintă caracterizarea genomului mamiferelor, după proporția fiecărei fracții cinetice de ADN. Pe abscisă este dată proporția de fracții în procente, iar pe ordonată – numărul de specii. În această figură se vede, că din punct de vedere al părții din genomul mamiferelor, unele fracții au o largă răspândire, iar la altele aceasta este semnificativ mai mică.

Fracția ce se reasociază foarte repede variază într-un cadru foarte larg, de la 3 la 25%. Mai frecvent se întâlnesc specii cu conținut mai mic al acestei fracții. Astfel, 50% dintre speciile analizate conțin 3-10% din acestă fracție, adică variază în jurul a 7%. Celelalte 50% dintre aceste specii conțin în componența acestei fracții, de la 10 la 25%, adică are loc o variație în limitele de 15%.

Fracția ce se reasociază repede se caracterizează printr-o răspândire foarte mică, din punct de vedere al conținutului relativ. Astfel, la 75% dintre specii, proporția fracției constituie 10-15%; spre deosebire de fracția foarte rapidă, o proporție foarte mică a acestei fracții (sub 10%) se observă doar la 15% dintre specii. Foarte rar se întâlnesc specii ce conțin 15-25%, din această fracție. Doar o singură specie are o mărime foarte mare a acestei fracții (38%) – *Bos taurus* (Davidson, Britten, 1973). Se crează impresia că selecția naturală

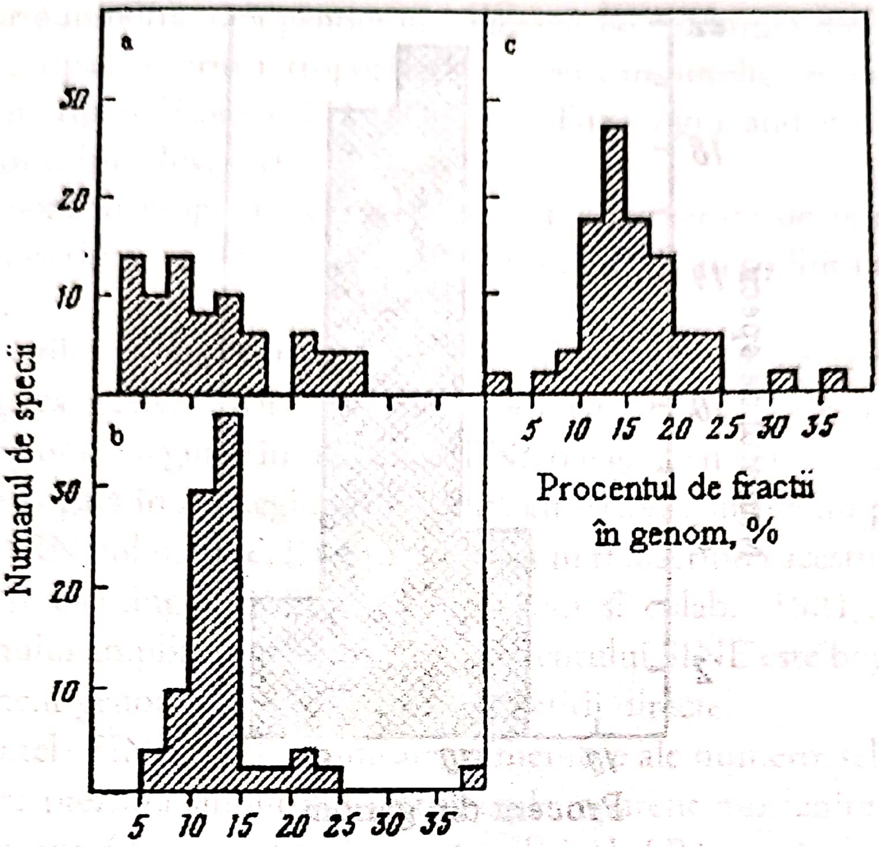


Fig. 5— Histograma conținutului relativ (în %) al fracției cu reasociere foarte rapidă (a), a fracției rapide (b) și a fracției intermediare (c), în genomul de mamifere (A. Ginatulin, 1984)

controlează destul de dur conținutul relativ al fracției foarte rapide – în limitele 10-15% din genom.

Răspândirea după conținutul relativ al fracției intermediare, la mamiferele studiate, este mult mai largă, decât în cazul fracției rapide. Astfel, la 75% dintre specii, proporția din genom a fracției intermediare constituie deja nu 10-15%, ci 10-20%, adică aria de fluctuații, în acest caz, este de 2 ori mai mare. Totodată, se întâlnesc și specii care nu au această fracție (*Bos taurus*) sau invers, specii care conțin o proporție foarte mare din genom cu această fracție – 30-35%.

În figura 6 este reprezentat conținutul relativ al repetițiilor și secvențelor unice în genomul mamiferelor, în funcție de numărul de specii. Se poate aprecia faptul că, conținutul total de repetiții la mamifere variază între 20-60%, iar proporția corespunzătoare de secvențe unice este de 40-80%. Cel mai frecvent se întâlnesc specii (80% dintre speciile studiate) cu un

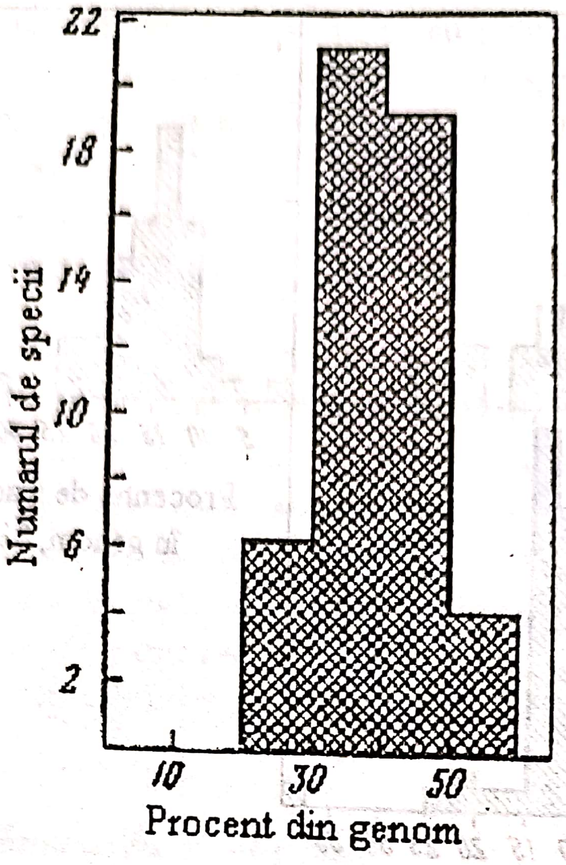


Fig. 6— Histograma conținutului relativ al fracției sumare de repetiții în genomul mamiferelor (A. Ginatulin, 1984)

conținut de repetiții de 30-50% și corespunzător cu conținutul secvențelor unice 50-70%. Valoarea medie a conținutului relativ de repetiții, calculată pentru 52 de specii și subspecii, este egal cu 38%, corespunzător secvențelor unice – 62%.

Au fost izolați retropozoni scurți sau elemente intersperse scurte (SINE) ce constituie 5-10% din genom la diferite organisme. Inițial CAN SINE-uri au fost izolate de la dihorul american și își derivă denumirea de la câine (*Canis*). Autorii dovedesc, pe baze moleculare (cercetarea băncilor de gene și PCR genomic), prezența secvențelor CAN SINE la toți reprezentanții familiei Carnivore. După modul de distribuție a acestor secvențe în genom, carnivorele pot fi grupate în două categorii – *caniforme* (câini, mustelide, racoon (*Procyon lotor*), urși și pinipede) și *feliforme* (pisici, civete (*Veverridae*), hiene).

O parte importantă a genomului eucariot este alcătuită din elemente mobile, propagate prin retropoziție – proces care implică transcripția și reverstranscripția [Rogers J.H. (1985) – The origin and evolution of retroposons. Int. Rev. Cytol. 93, 187-279].

Retropozonii lungi (LINE) codifică activități cerute de retropozoție (reverstranscriptaza și endonucleaza), pe când SINE nu codifică asemenea activități.

SINE-urile sunt repetiții genomice de 80-400 pb lungime, care aparent își au originea în ARN (mai comun în ARNt). Un element SINE tipic constă din trei regiuni: o regiune înrudită cu ARNt, o regiune neînrudită cu ARNt, o regiune bogată în A. Regiunea înrudită cu ARNt conține un promotor intern al ARN polimerazei III și este utilizat în transcripția acestui element (Daniels și Deininger, 1985; Jagadeeswaran și colab., 1981). Pe baza mecanismului amplificării, partea 3' a elementului SINE este bogată în A, acest element genomic fiind flancat de repetiții directe.

Elementele SINE pot fi clasificate ca membre ale numeroaselor superfamilii care prezintă similitudini structurale, aparent moștenite de la un strămoș comun (de ex. mebri ai superfamiliei Alu/ B1 care își au originea într-un element vechi FAM (Quentin, 1992). Marea majoritate a elementelor SINE din genom nu au capacitatea de amplificare activă, datorită prezenței unor puține secvențe *master*. Cele din superfamilia CORE s-au amplificat cândva de timpuriu, în evoluția vertebratelor, după care au devenit inactive (Gilbert și Labuda, 2000), pe când secvențele ALU prezintă încă amplificare (Leeflang și colab., 1992). Nu se cunosc mecanisme de eliminare pentru SINE, astfel că asemenea elemente sunt păstrate în genomuri ca succesori ai elementelor SINE amplificate cu sute de milioane de ani în urmă: *MIR* se întâlnesc la mamifere, pe când *Alu* este specific primatelor, fiind utilizate ca markeri filogenetici independenți (Kramerov și colab., 1999; Murata și colab., 1993).

Elementele SINE au fost identificate prima dată la primate și rozătoare (Krayev și colab., 1980; Rubin și colab., 1980), dar acum se știe că ele se întâlnesc ca familii diferite la cele mai multe, dacă nu la toate eucariotele.

De obicei, o familie SINE are peste 100.000 copii per genom haploid, pe când altele sunt mai puțin abundente (genomul de șoarece conține 100.000 de elemente SINE tip B1, 100.000 elemente SINE de tip B2 și doar 40.000 elemente SINE ID (Kramerov și colab., 1979; Kass și colab., 1996).

La carnivore, retrotranspozonii scurți CAN au fost descoperiți la *Mustela vision* (dihorul american) de către Lavrentzeva și colaboratori (1989), apoi la câine (Minnick și colab., 1992) și la altele. Aceștia au constituit o familie tipică de elemente SINE înrudite cu ARNt, înalt repetate în genom (~400.000/genom haploid de câine – Bentolita și colab., 1999).

Vassetzky și Kramerov (2002) au stabilit că elementele SINE de tip CAN se întâlnesc în genomurile tutror liniilor de carnivore.

CAN este un retropozom, tipic înrudit cu ARNt, având o lungime de 170pb cu o variație între 150 și 280, dată de secvența regiunii polipirimidinice a cozii bogate în A, ca și unor inserții și/sau deleții. Ca și alți retropozomi, elementele CAN sunt flancate de scurte repetiții directe ale ADN gazdă, indiciu al unui eveniment de retropoziție, regiunea înrudită cu ARNt conține posibile cutii ale promotorului pentru ARN polimeraza III. Partea 3' a CAN conține o regine polipirimidinică [un motiv (TC)n] și o coadă bogată în A cu semnalul de poliadenilare AATAAA și terminatorul pentru ARN polimeraza III, TTTT sau TCTTT, întâlnit în multe copii CAN.

Ca și alte tipuri de SINE, secvențele CAN au o considerabilă variație, datorită numeroaselor substituții uninucleotidice și inserții/deleții. De notat este faptul că o parte semnificativă din această variabilitate rezultă din mutația situsurilor CG, mediată de metilare, acestea devenind TG sau CA (Bird, 1980).

S-au estimat 300.000 de copii CAN la mustelide, 200.000 la pisici și morse și 150.000 la câini și urși.

Similitudinea de secvență dintre secvența consens a familiilor CAN și secvența consens a ARNt-urilor (atât TTT cât și CTT) pentru lizina umană este de 70-79%.

Datele derivate din PCR dovedesc absența CAN din genomul mamiferelor necarnivore.

2. ORGANIZAREA GENOMULUI MAMIFERELOR

2.1.ORGANIZAREA GENOMULUI LA OM

Studiind reasocierea fragmentelor de ADN de diferite lungimi la om, Schmid și Deininger (1975) au arătat că secvențele unice, cu lungime medie de 2 kb, alternează în mod regulat cu repetiții de 0,3-0,4 kb. Aceastea constituie 52% din întreg genomul. Cealaltă jumătate din genom este ocupată de succesiuni mai lungi, de lungime nedefinită (Schmid și Deininger, 1975). Repetițiile inverse sunt foarte mult răspândite în genom. Dimensiunea lor, în majoritatea cazurilor, este egală cu dimensiunea repetițiilor scurte și constituie ~ 0,3 kb. Distanța dintre repetițiile inversate variază de la 0,1 la 20 kb, în medie această distanță este de 4,6 kb. Cantitatea lor nu depășește 5% (Schmid și Deininger, 1976). S-a arătat că repetițiile inversate, repetițiile obișnuite și secvențele unice, în mare parte, se suprapun unele cu altele. Cantitatea repetițiilor inversate, după Deininger și Schmid (1976), este de 1,2 x 10^5, după Dott și colaboratorii (1976) – de 10 ori mai mare. Aproape aceeași răspândire a succesiunilor s-a identificat în ADN extras din celule leucemice umane (Torelli și colab., 1979).

Un anumit interes îl reprezintă analiza comparativă a răspândirii secvențelor în fragmente ADN de 2 kb din leucocite și ADN din spermatozoizi (Hernandez și colab., 1978). Profilele curbelor cu aceeași lungime a fragmentelor ADN din spermatozoizi diferă considerabil și indică faptul că în ADN din spermatozoizi, secvențele unice cu perioadă scurtă se suprapun numai cu repetițiile intermediare (C_0t 10^{-1}-10^{-2}), iar repetițiile inversate și repetițiile moderat rapide sunt organizate în clustere.

În general, însă, organizarea genomului uman, seamănă foarte mult cu organizarea „clasicului" genom de tip „*Xenopus*".

2.2. ORGANIZAREA GENOMULUI LA HAMSTERI

Pentru clarificarea distribuției secvențelor ADN în genomurile hamsterilor, în completare la cinetica reasocierii fragmentelor scurte, s-au obținut curbele cineticii reasocierii fragmentelor lungi de ADN, la patru specii. Înregistrarea mersului reacției de reasociere s-a făcut cu ajutorul cromatografiei pe hidroxiapatită. S-au utilizat fragmente cu dimensiune

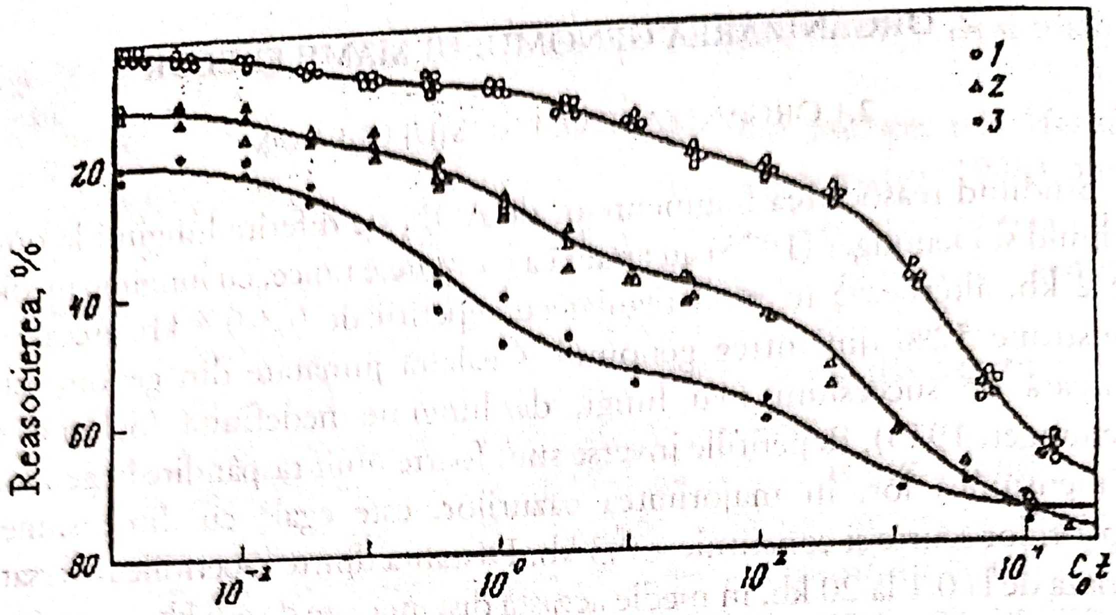


Fig. 7 — Cinetica reasocierii fragmentelor ADN cu lungimea de 0,3 kb (1), 2,9 kb (2) și 18 kb (3), la *Cricetulus barabensis* (A. Ginatulin, 1984)

medie de 2,9 și 1,8 kb, pentru ADN de la *C. barabensis*; 4,5 kb – *T. triton*; 4,0 și 10 kb – *M. auratus*; 1,5 și 11 kb – *C. cricetus*. Curbele cineticii reasocierii acestor fragmente ADN la *C. barabensis* sunt prezentate în figura 7.

Pe baza curbelor cinetice se pot observa aceleași componente ADN care au fost evidențiate pentru fragmentele scurte, - aceasta este fracția care se reasociază foarte rapid ($C_0t<10^{-3}$), fracția care se reasociază rapid ($C_0t<10^{-3}$-$8x10^{-1}$), fracția intermediară (C_0t10-$3x10^1$), și fracția ce se reasociază lent ($C_0t >3x10^1$).

Caracteristic pentru toate tipurile de hamsteri este faptul că, la creșterea lungimii fragmentelor ADN, fracția de succesiuni unice se micșorează, dar, în măsură diferită, la diferite specii. Dacă pentru unele specii, la trecerea de la fragmente de 0,3-0,4 kb, la fragmente de 1,5-4,5 kb, micșorarea părții acestei fracții este nesemnificativă (pentru *T. triton*, doar 1,6%), pentru alte specii, aceasta este destul de însemnată (12%, pentru *M. auratus*) și chiar mare (17%, pentru *C. cricetus* și 21%, pentru *C. barabensis*). Aceste date demonstrează că în genomul hamsterilor există o perioadă scurtă de alternare a secvențelor unice și repetitive de tip „*Xenopus*", dar acest tip de alternare este prezentat în proporție diferită, la diferite specii: cel mai mult este exprimat la *C. barabensis* și la *C. cricetus*, mai puțin la *T. triton*, iar intermediar la *M. auratus*. Mărirea ulterioară a lungimii fragmentelor de la 10 la 20 kb, nu duce la schimbarea proporției fracției unice, la *M. auratus*, dar duce la micșorarea proporției acestei fracții la *Cricetus* (11%), și *C. barabensis* la (19%). La unii hamsteri, există secvențe repetitive și unice cu perioade scurte și perioade moderat de lungi de alternare, comparabil cu lungimea maximă a fragmentelor utilizate și, caracteristic pentru un genom construit după tipul „*Drosophila*". Printre hamsteri, această perioadă moderat de lungă de alternare este cel mai mult exprimată la *C. barabensis* și la *Cricetus*. La *M. auratus*, o mare parte din secvențele unice au, probabil, lungimea care depășește considerabil dimensiunea fragmentelor utilizate, adică aceea a secvențelor unice care la această specie depășesc lungimea perioadei de alternare, cu câteva zeci de mii de perechi de nucleotide, adică perioada de alternanță, caracteristică pentru tipul „*Albatros*" de organizare genomică (în genom există perioade foarte lungi de alternare a secvențelor unice și repetitive, de ordinul zecilor de kb). La *T. triton*, aproape toate secvențele unice sunt foarte lungi, de peste 4,5 kb.

Organizarea genomică la speciile studiate de hamsteri nu este asemănătoare, dar după indicatori separați de organizare genomică, între specii se pot identifica și elemente de asemănare. Astfel, secvențele unice scurte, care alternează cu repetiții, pe o zonă de 1,5-3 kb, constituie la *C.barabensis* 21,2% din genom, sau 30,3% din toate secvențele unice, la *Cricetus* – 17,0% și, respectiv 27,6%, la *M. auratus* – 12,3% și 21,5%, în timp ce la *T.triton* – 1,6% și 2,8%. Dacă se ține cont că dimensiunea fragmentelor medii la *Cricetus cricetus* este de două ori mai mică decât la alte specii, atunci se poate presupune că la aceste specii sunt mai multe succesiuni unice scurte. La o lungime medie a fragmentelor la *C. barabensis* și la *Cricetus* peste 50% din ADN reasociabil se leagă cu hidroxiapatita, prin urmare, peste 50% din fragmente cu lungimea de 2-4 kb conțin secvențe repetitive și secvențe unice ce se învecinează cu acestea. Organizarea genomică la *C. barabensis* și la *Cricetus* trebuie atribuită tipului „*Xenopus*". Deosebirea dintre *C. barabensis* și *Cricetus* constă în faptul că la *C. barabensis*, în alternarea cu secvențele unice scurte sunt implicate și repetițiile foarte înalte și intermediare, iar la *Cricetus* – doar cele foarte înalte. Aceasta, probabil, este dată de faptul că la *Cricetus* s-au identificat repetiții ce se reasociază foarte rapid, așezate mai dispersat, lângă secvențele altor fracții, iar la *C. barabensis* – mai compact, în formă de blocuri (clustere) formate din câțiva monomeri, pe un fragment lung de ADN. Spre deosebire de aceste specii, la *M. auratus* cea mai mică parte, iar la *T. triton* o parte chiar infimă a genomului este ocupată de secvențe unice scurte, învecinate cu repetiții.

Dintre toate secvențele unice ale genomului, cele mai puțin lungi de 3-20 kb, adică, comparabile cu dimensiunea acelorași sectoare de ADN, de la *Drosophila*, constituie 28%, la *C. barabensis*, 18%, la *Cricetus* și doar 0,2%, la *M. auratus*. Astfel, perioada de interspersie de tip „*Drosophila*" este mai bine exprimată la primele două specii și lipsește la *M. auratus* și, probabil, la *T. triton*.

O parte considerabilă a genomului la speciile studiate interesează secvențele unice, foarte alungite: 29% la *C. barabensis*, 34% la *Cricetus*, 46% la *M. auratus* și peste 50% la *T. triton*.

O mare asemănare între *C. barabensis* și *Cricetus*, din punct de vedere al organizării moleculare a genomului, confirmă concluziile despre asemănarea dintre aceste specii, ce aparțin diferitor genuri, concluzii elaborate anterior pe baza cercetărilor citologice.

Din datele obținute, se constată că secvențele unice scurte, în genomul de *C. griseus*, reprezintă o fracție importantă a genomului mamiferelor.

Cercetările efectuate asupra organizării genomice la hamsteri au arătat că există o bună coordonare cu așezarea sistematică a speciilor, din punct de vedere cantitativ, al răspândirii și așezării reciproce a grupelor de secvențe. Din punct de vedere al organizării genomice, o mare asemănare există la *Cricetulus* – *C. barabensis* și *C. griseus*. Apropiat de ei, după organizarea genomică, este reprezentantul altui gen – *Cricetus cricetus*.

2.3. ORGANIZAREA GENOMULUI LA POPÂNDĂI

Distribuția secvențelor ADN de diferite tipuri a fost studiată la 5 specii de popândăi: *Citellus undulatus*, *C. pygmaeus*, *C. parryi*, *C. major* și *C. fulvus* (Ginatulin și colab., 1980; 1983). S-a studiat caracterul schimburilor parametrilor cinetici la utilizarea fragmentelor de ADN mai lungi – 2-3 kb (în afară de *C. major*) și 10-15 kb.

La utilizarea în experiment a fragmentelor cu lungimea de 2-3 kb, proporția materialului capabil să se lege de hidroxiapatită la C_0t 60, se mărește doar nesemnificativ (cu 4-7%), în comparație cu aceeași, la utilizarea fragmentelor scurte de ADN (0,25-0,3 kb). Aceasta indică un grad nu prea mare de interspersie, cu perioadă scurtă a secvențelor repetitive și unice. Secvențele unice, lungimea cărora este mai mică de 2-3 kb, constituind doar 7-8% din toată componența nerepetitivă la *C. parryi* (fig. 8) și *C. pygmaeus* (aproximativ 4% din genom) și 11%, la *C. undulatus* și *C. fulvus* (fig. 9) (6-7% din genom). Din trei fracții de secvențe repetitive, doar proporția fracției foarte rapide se mărește la 6-10%, pe când proporția fracției rapide și fracției intermediare sau are aceeași valoare, ca și la lungimea fragmentelor de 0,3 kb, sau se micșorează la 1-5%. Doar la *C. fulvus* proporția fracției intermediare crește ușor (fig. 9).

Aceste date confirmă faptul că, la majoritatea speciilor, secvențele fracției foarte rapide alternează cu o perioadă scurtă atât cu secvențele unice, cât și, parțial, cu cele ce se repetă și se reasociază mai lent.

Analiza rezultatelor obținute prin utilizarea în experiment a fragmentelor foarte lungi (10-15 kb) pune în evidență mai multe diferențe dintre specii, decât la utilizarea fragmentelor mai scurte. Proporția fracției secvențelor nerepetitive se micșorează, dar în diferită măsură la diferite specii (fig. 8 și 9). Mărirea lungimii fragmentelor de 4-6 ori (de la 2-3, la 10-15 kb) oferă o scădere nesemnificativă a fracției unice (sub 1%), la *C. parryi*, puțin mai mult (la 7%), la *C. undulatus* și o scădere semnificativă (la 17-24%),

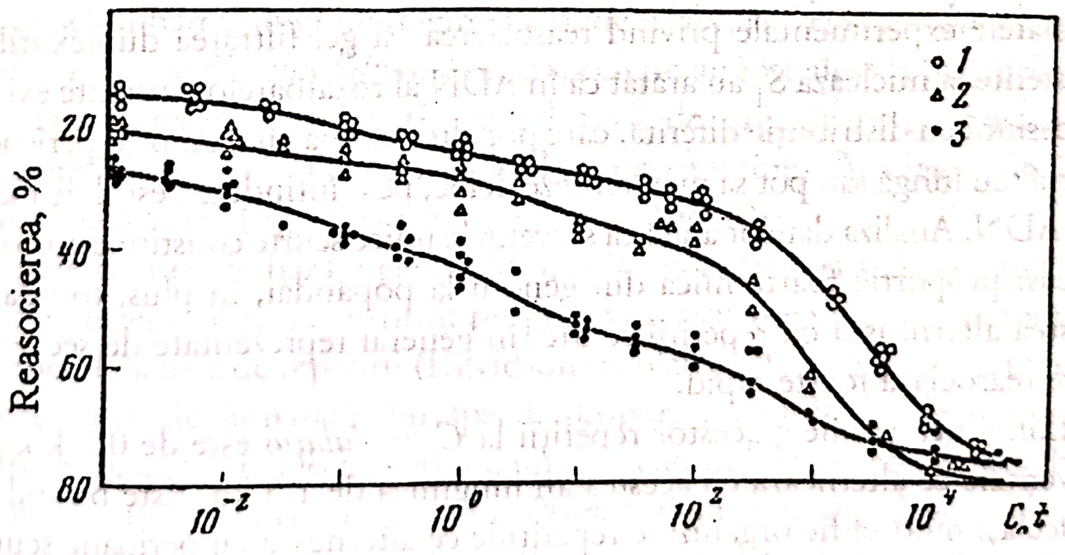


Fig. 8. Cinetica reasocierii fragmentelor ADN cu lungimea de 0,25 (1), 2,7 (2) și 10 kb (3) la *Citellus parryi* (A. Ginatulin, 1988)

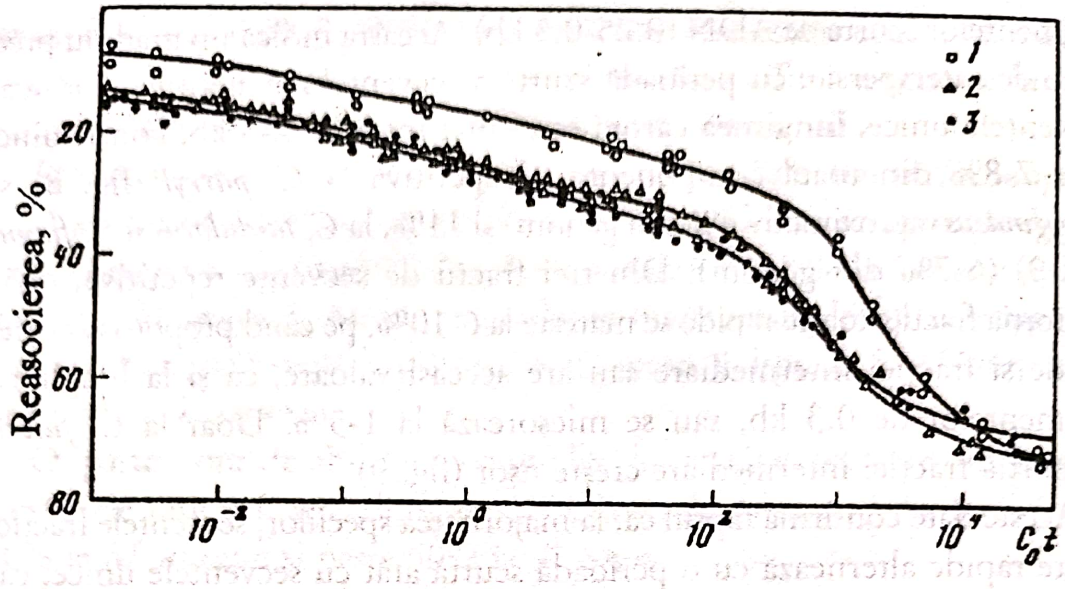


Fig. 9— Cinetica reasocierii fragmentelor ADN cu lungimea de 0,3 (1), 2,9 (2) și 12 kb (3) la *Citellus fulvus* (A. Ginatulin, 1988)

la două specii – *C. pygmaeus* și *C. fulvus*. Proporția fiecărei fracții repetitive aproape că nu se schimbă la *C. parryi*, crește la 2-4%, la *C.undulatus* și la 4-10%, la *C. pygmaeus* și *C. fulvus*. După caracterul schimbării cineticii fracțiilor și a lungimii fragmentelor de la 0,3 la 10 kb, genomul de *C. major* se aseamănă mai mult cu genomul de *C. pygmaeus* și *C. fulvus*, decât cu genomul de *C. parryi* și *C. undulatus*.

Datele experimentale privind reasocierea și gel filtrarea duplexurilor rezistente la nucleaza S_1 au arătat că în ADN al rozatoarelor studiate există succesiuni cu distribuție diferită, care pot alterna una cu alta, pe o perioadă scurtă sau lungă sau pot să nu alterneze deloc, pe o întindere destul de mare din ADN. Analiza datelor arată că secvențele unice scurte constituie aproape aceeași proporție foarte mică din genom la popândăi, în plus, totodată, acestea alternează cu repetiții scurte, în general reprezentate de secvențe ce se reasociază foarte rapid.

Lungimea medie a acestor repetiții la *C. undulatus* este de 0,7 kb, iar secvențele ce alternează cu acestea au lungimea de 1,5 kb. Este posibil ca în același mod să fie organizate repetițiile ce alternează cu perioade scurte și secvențele unice în genomurile celorlalte specii de popândăi. Cantitatea totală a secvențelor de acest fel, la popândăi, nu depășește 15-20%. Restul de 80-85% din genom reprezintă secvențe mai întinse.

În afară de acestea, în genomul unor specii există secvențe unice ce alternează cu repetiții cu perioade mai puțin lungi, peste 3 kb. Proporția secvențelor de acest fel este mai mică la *C. parryi* (1%) și la *C. undulatus* (7%), este intermediară, la *C. pygmaeus* și *C. major* (15-17%), și mai mare la *C. fulvus* (24%).

Astfel, diferențele în posibilitatea organizării genomului la popândăi se corelează foarte bine cu poziția sistematică a speciilor. Se estimează că 20% din genom sunt implicate în alternare cu perioadă scurtă a secvențelor unice și repetitive. Deci, nici o specie studiată nu are genomul structurat de tip „*Xenopus*". Comparând datele obținute cu datele despre organizarea genomului la alte eucariote se poate constata asemănarea organizării genomului la *C. fulvus* cu cel de la *Drosophila*, iar organizarea genomului la *C. parryi* și *C. undulatus* – cu cel de tip „*Albatros*". *C. pygmaeus* și *C. major* ocupă o poziție intermediară între aceste forme, dar mai aproape de *C. fulvus*.

2.4. DIVERSITATEA POSIBILITĂȚILOR DE ORGANIZARE A GENOMULUI LA MAMIFERE

Pentru ilustrarea rezultatelor privind organizarea genomului mamiferelor au fost prezentate figurile 7-9 ce arată schimbarea curbelor cineticii reasocierii față de schimbarea lungimii fragmentelor de ADN, la *Cricetulus barabensis*, *Citellus barryi* și *Citellus fulvus*. Aceste specii nu au fost alese la întâmplare. Ele demonstrează cele 3 variante „clasice" de organizare genomică la eucariote, identificate la același ordin de rozătoare: tipul „*Xenopus*" (fig. 7), tipul „*Drosophila*" (fig. 9) și tipul „*Albatros*" (fig. 8).

Caracteristica de bază a genomului, pe baza căreia s-a stabilit tipul de organizare genomică, a constituit proporția de secvențe unice ce alternează cu perioade scurte de repetiții (Davidson și colab., 1975). S-a constatat că, la mai puțin de jumătate din specii, proporția acestui tip de secvențe constituie peste 50%. Deci, genomul uman, genomul de șoarece, de șobolan și genomul unor hamsteri (*Cricetus, Phodopus*) sunt de tip „*Xenopus*". La toți popândăii și la hamsterul *Tscherskia*, astfel de secvențe constituie sub 20% din genom. O poziție intermediară o ocupă hamsterul auriu (*M. auratus*) și ambele tipuri de paracopitate – 30-40% secvențe scurte. Cealaltă parte a genomului tuturor speciilor se caracterizează prin perioade de alternanță moderat de lungi (de tip „*Drosophila*" – 3-20 kb) și superlungi (de tip „*Albatros*" – zeci de kb), perioade de alternanță a secvențelor repetitive și unice. Tipul „*Drosophila*" de organizare genomică este caracteristic pentru *Citellus pygmaeus*, *C. major*, *C. fulvus*. Tipul „*Albatros*" – *C. undulatus* și *C. parryi*, dar și la porc *Sus scrofa* și la hamsteri: *T. triton* și *M. auratus* (Moyzis și colab., 1981). Astfel, în general, este necesar de menționat că la mamifere nu există universalitate în organizarea genomului. Alături de tipurile „clasice" de organizare genomică pot fi găsite diferite forme intermediare. Diferențele se constată nu numai la reprezentanții diferitor ordine, dar și în cadrul aceluiași ordin, familie, dar și specie de rozătoare. Deocamdată, nici o altă clasă de vertebrate studiate nu demonstrează o astfel de diversitate în organizarea genomică.

Interesantă este comparația în organizarea genomică la două specii de popândăi care au arealuri învecinate, dar izolate prin bariera geografică reprezentată de râul Prut. Este vorba de *Citellus citellus*, din România și *Citellus suslicus*, din Republica Moldova. Cercetările preliminare, efectuate de Gavrilă și colaboratorii (1995-1998) au evidențiat diferențe în organizarea cariotipică a acestor două specii.

În cadrul unui studiu privind diversitatea genomică la unele mamifere din diverse populații naturale din România realizat de Gavrilă și colaboratorii (1996) au fost luate în studiu specii deosebit de interesante nu numai din punct de vedere faunistic, în general, dar și din punct de vedere citogenetic.

La *Elyomis quercinus* a fost remarcată instabilitatea morfologică a genomului și a cariotipului, astfel că numărul de cromozomi este variabil de la 48 la 54, iar NF variază între 82-88. Există o corelație directă între numărul de cromozomi și locul de origine a specimenelor capturate (la specimenele capturate în regiunea de câmpie numărul de cromozomi este mai mic decât la specimenele capturate în zonele alpine).

La *Glis glis* s-a stabilit că există un complement cromozomal cu $2n = 62$ și un $NF = 124$. Aceasta însemnă că toți cromozomii sunt metacentrici, submetacentrici sau subtelocentrici. La acestă specie s-au pus în evidență cazuri de hipodiploidie și cazuri de hiperdiploidie, hiperdiploidia fiind în mod cert datorată prezenței cromozomilor supranumerari de tipul cromozomilor B.

În cadrul genului *Myotis* s-a evidențiat un complement cromozomal tipic pentru un gen primitiv, în care abundă cromozomi metacentrici și submetacentrici. Nu s-au pus în evidență cromozomi supranumerari sau variații intraindividuale a numărului de cromozomi.

La specia românească de arici *Erinaceus roumanicus* s-a aplicat o metodologie originală de evidențiere a cromozomilor (care de altfel s-a aplicat și în cazul genului *Myotis*). Analiza cariotipică a evidențiat un cariotip standard fără variații intraindividuale. Cariotipiul de *Erinaceus roumanicus* este un cariotip de tip primitiv, simetric, singurele elemente de asimetrie fiind reprezenate de telocentrici și microcromozomi.

La *Sicista betulina* s-a realizat pentru prima dată la noi în țară un studiu cariotipic, ca de altfel și la *Muscardinus avellanarius* și *Glis glis*. Prezintă un complement cromozomal cu 2n = 32, fără variații numerice intraspecifice. Materialul prezentat de Gavrilă și colaboratori confirmă datele din literatura de specialitate. Cariotipul ascestei specii este de tip evoluat, prin abundența telocentricilor și acrocentricilor, dar care au ajuns la un grad înalt de stabilitate, afirmație bazată pe constanța numărului de cromozomi în toate celulele analizate.

La specia *Muscardinius avellanarius* cariotipul are 2n = 46 de cromozomi, cu NF = 90. Cariotipul este, de asemenea, de tip primitiv, cu abundență de metacentrici, submetacentrici și subtelocentrici. Comparativ cu celelelate genuri de pârși (*Glis* și *Elyomis*), *Muscardinus avellanarius* prezintă o remarcabilă constanță a cariotipului.

Cercetările lui Tumennasan (1977), privind studiul citogenetic comparativ la câteva specii din familia *Bovidae*, a demonstrat că toate cele cinci rase de oaie domestică originare din România și din Mongolia și muflonul european au un complement cromozomal identic (2n=54) ca număr și morfologie, fiind alcătuit din 23 perechi de acrocentrici și 3 perechi de metacentrici mari și o pereche de heterozomi. Iar Argalul din Mongolia are 56 de cromozomi dintre care 2 perechi de metacentrici și 24 perechi de acrocentrici și o pereche de cromozomi de sex.

Cele trei perechi de cromozomi metacentrici mari nu prezintă heterocromatină constitutivă. În schimb, toți autozomii acrocentrici au blocuri de heterocromatină constitutivă foarte evidențiată în regiunea centromerică. Cromozomul X nu prezintă heterocromatină constitutivă centromerică la nici una din speciile studiate, iar cromozomul Y prezintă heterocromatină constitutivă pe întreaga sa lungime.

Taisencu E. (1979) a realizat un studiu asupra complementului cromozomal la unele specii de pești din România. Complementul cromozomal la pești este alcătuit din autozomi și uneori cromozomi ai sexului sau perechi heteromorfe caracterizate sau nu ca gonozomi. Polimorfismul cromozomal intraindividual a fost detectat la două specii: la *Salmo irideus* ($2n=58$-62) – un polimorfism de tip non-robertsonian, caracterizat prin numere diferite de cromozomi în celulele aceluiași individ cu o variație corespunzătoare a numărului fundamental. La *Lepomis gibbous* ($2n=48$, $2n=47$) s-a evidențiat un polimorfism cromozomal de tip robertsonian tradus prin existența a două numere cromozomale în celulele aceluiași individ păstrând însă același NF.

La speciile de *Acipenser ruthenus* și *Acipenser stellatus* complementul cromozomal se caracterizează printr-un număr mare de cromozomi ($2n=120\pm$, în ambele cazuri) dintre care aproximativ jumătate sunt microcromozomi. Numărul mare de cromozomi precum și prezența microcromozomilor în cariotipul tuturor speciilor de acipenseride analizate citogenetic pare să fie o caracteristică a complementului cromozomal al întregii familii.

Studiul citogenetic comparativ al unor populații românești de păstrăvi curcubeu (*Salmo irideus gairdneri*) evidențiază un polimorfism cromozomal intraindividual și intraspecific ($2n=58$-63) tradus printr-o permanentă variație a numărului de cromozomi în jurul numărului modal ($2n=60$). Polimorfismul se datorează unor aneuploidizări prin non-disjuncție cromozomală și nu unor fenomene de tip robertsonian, așa cum arată S. Ohmo și colaboratorii (1965), deoarece cu fiecare cariotip variază și numărul total de brațe cromozomale NF.

Faptul că speciile genului *Gobio*: *G. gobio*, *G. kessleri banaticus* și *G. albipinnatus vladicovi* au același număr de cromozomi, $2n=50$ și același număr de brațe cromozomale $NF=98$ sugerează, în cadrul grupului, o evoluție a cariotipului prin duplicația unor segmente cromozomale sau prin translocații. Specia *G.uranoscopus* este mai bine individualizată atât prin numărul de cromozomi, $2n=52$, cât și prin structura complementului cromozomal care realizează un număr total de brațe cromozomale $NF=100$.

În cadrul acestui studiu a fost evidențiată existența în fauna României a unei specii noi de *Cobitis taenia* nesemnalată până la efectuarea acestui studiu. Ca morfologie externă este deosebit de asemănătoare cu specia *Cobitis* *taenia* (motiv pentru care au fost considerate o singură specie) însă numărul diploid și structura complementului cromozomal diferă considerabil. Pentru a le distinge le-a fost atribuită o nomenclatură convențională: *Cobitis taenia 1*, pentru specia cea mai răspândită, cu un complement cromozomal 2n=76 care realizează un număr total de brațe cromozomale NF=142 și *Cobitis taenia 2*, specie detectată în apele barajului de pe lacul Blojde (jud. Dolj) cu 2n=50 și NF=98.

3. DIMENSIUNEA GENOMULUI

Prima mare referire asupra conținutului de ADN în celulele mamiferelor a fost facută de către Bachmann (Bachmann, 1972). El a prezentat valorile 2C, la 43 de specii de mamifere, din ambele subclase. Acum există date pentru peste 200 specii de mamifere.

Prezentarea concretă a distribuției valorilor 2C la mamifere este dată în histograma din figura 10.

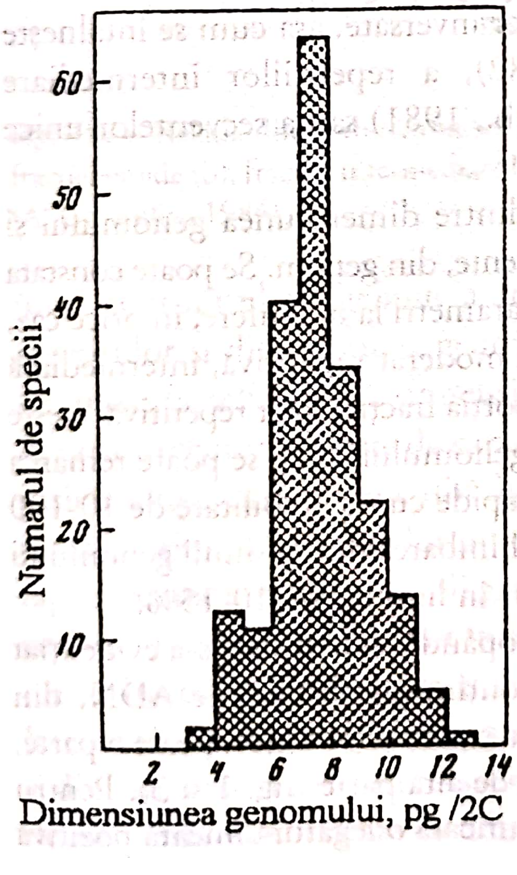


Fig. 10 — Histograma dimensiunilor genomice la mamifere (pg/2C).
La 70% dintre specii, mărimea genomului oscilează de la 6 la 9 pg, valoarea medie pentru 202 specii – 7,8 pg (A. Ginatulin, 1984)

Dimensiunile genomice la mamifere se situează de la 3,7 pg, la o specie dintre chiroptere, până la 12,2 pg, la *Orycteropus afer*, unicul reprezentant al ordinului cu același nume. Însă, valorile de bază oscilează în limite mai mici: 80% din specii au 2C = 6-10 pg, iar 70% din specii au 2C = 6-9 pg. Valoarea medie pentru 202 specii este de 7,8 pg. Între mamifere, un genom mic au chiropterele, iar printre acestea – liliecii din familia *Vespertilionidae* (Romanini, 1973, 1975).

Interesant ar fi fost de a încerca să se identifice secvențele ADN răspunzătoare de variațiile în dimensiunea genomului, la mamifere. Cercetarea cineticii reasocierii fragmentelor scurte de ADN, la liliacul *Myotis* și ariciul *Erinaceus amurensis*, ce au diferențe duble în dimensiunile genomice, au arătat că, la chiroptere, în decursul evoluției, pierderea ADN s-a realizat proporțional în toate tipurile de secvențe, repetitive sau unice (Ginatulina, 1982; Ginatulin și Ginatulina, 1979; Ginatulina și colab., 1980). În mod asemănător, contribuțiile la toate componentele genomului, sunt însoțite de diferențe duble și în dimensiunile genomului la *Cricetus cricetus* și *Mesocricetus auratus*. La unele specii, la schimbarea mărimii genomului, în comparație cu genomurile speciilor înrudite, s-a observat o schimbare selectivă a cantității repetițiilor inversate, așa cum se întâlnește la *Tscherskia triton* (Ginatulina, 1982), a repetițiilor intermediare (*Muntiacus muntjiak* (Schmidtke și colab., 1981) sau a secvențelor unice (*Citellus dauricus* (Ginatulina, 1982)).

În figura 11 este prezentată relația dintre dimensiunea genomului și conținutul relativ al fiecărei fracții, în procente, din genom. Se poate constata lipsa unei anumite corelații între acești parametri la mamifere, în orice caz, aceasta este valabilă în raport cu fracțiile moderat repetitivă, intermediară și unică de secvențe genomice. Doar proporția fracției înalt repetitivă, crește în concordanță cu mărirea dimensiunii genomului. Aici, se poate remarca încă o dată faptul că, proporția fracției rapide cu repetabilitate de 10-100 mii este foarte stabilă la mamifere și la schimbarea dimensiunii genomului de 2 ori, ea variază, cu rare excepții, doar în limitele de 10-15%.

Prin studiul structurii genomului la popândăi și hamsteri s-a evidențiat existența unei corelații pozitive între conținutul absolut de ADN, din componența repetițiilor și în componența secvențelor unice, pe de o parte, și conținutul ADN în tot genomul – pe de altă parte (fig. 1 și 3). Pentru popândăi, în afară de aceasta, a fost identificată o legătură lineară pozitivă

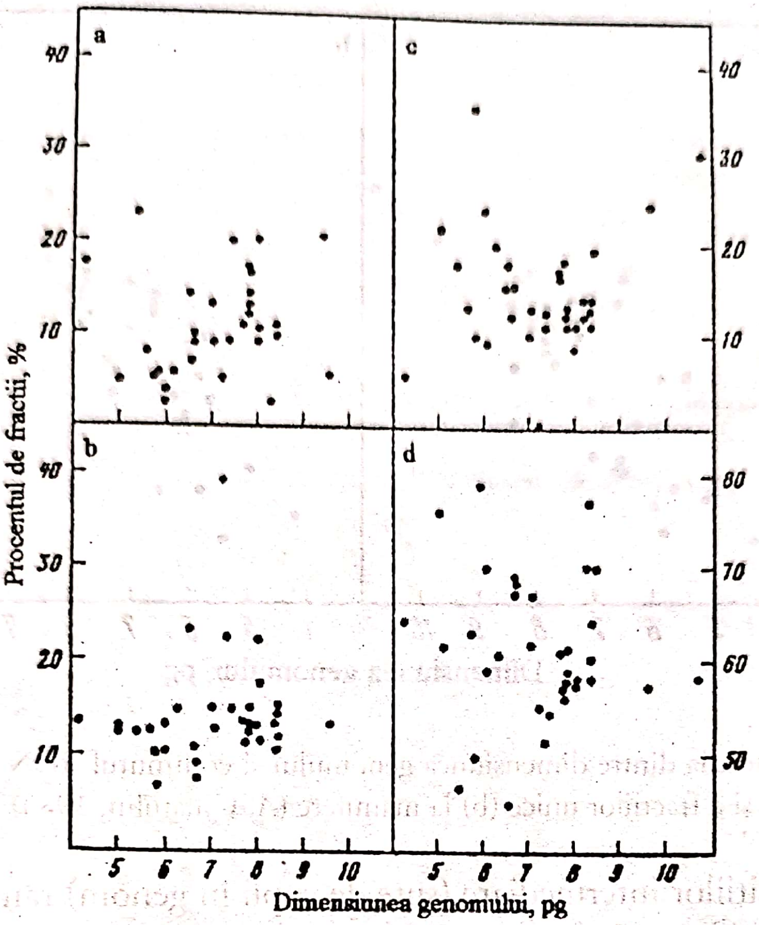


Fig. 11 — Relația dintre dimensiunea genomului și proporția fracției foarte rapide (a), fracției rapide (b), fracției intermediare (c) și fracției lente de asociere a ADN, la mamifere (A. Ginatulin, 1984)

între conținutul în genom a fracției foarte rapide și fracției rapide a repetițiilor și dimensiunea genomului. Doar fracția intermediară, nu s-a schimbat la schimbarea dimensiunii genomului, în cadrul acestui grup. Apare întrebarea: cât este de caracteristică și pentru alte mamifere legitatea găsită? După cum se vede din figura 12, atât conținutul total de repetiții, cât și conținutul secvențelor unice la mamifere crește în aceeași măsură în raport cu mărirea dimensiunii genomului. Deci, la schimbarea dimensiunii genomului mamiferelor sunt implicate atât secvențele repetitive, cât și cele unice. În ceea ce privește fracțiile repetitive separate (fig. 13), dimensiunile fracției foarte rapide (palindroamele, și posibil, secvențele înalt repetitive) și dimensiunile fracției cu reasociere rapidă (zeci de mii de copii în genom), de asemenea, se corelează cu dimensiunea întregului genom. La mamifere,

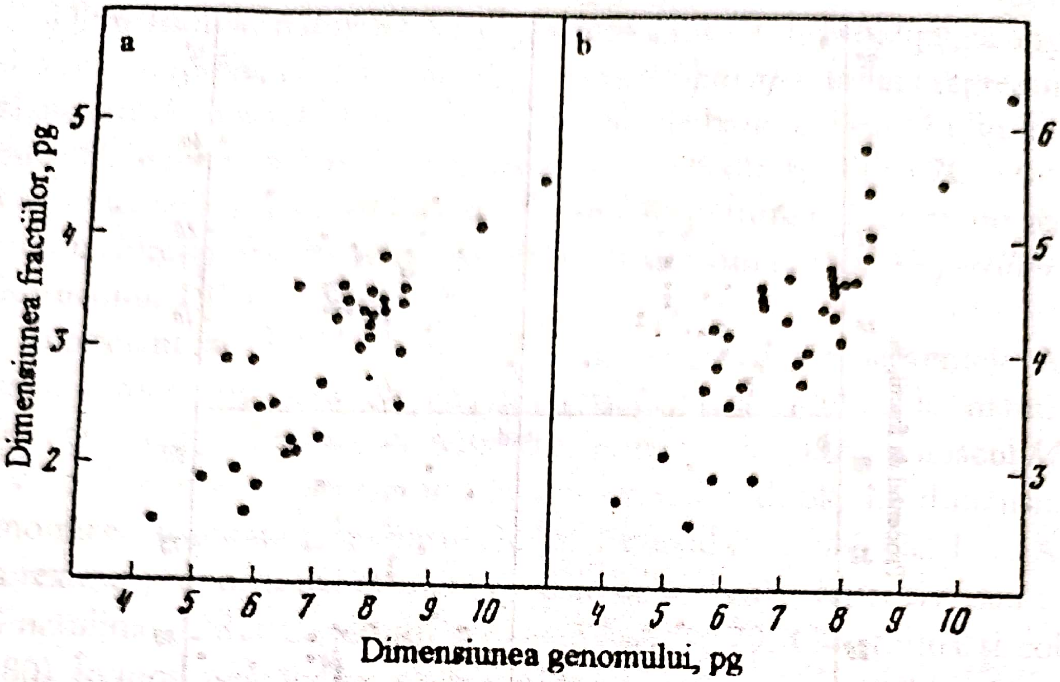


Fig. 12— Corelația dintre dimensiunea genomului și conținutul ADN în componenta repetițiilor (a) și a fracțiilor unice (b) la mamifere (A. Ginatulin, 1984)

fracția repetițiilor intermediare (sute de copii în genom) rămâne, în mare masură, constantă, din punct de vedere al conținutului. Astfel, ceea ce s-a identificat în organizarea genomică la *Citellus*, se regăsește și pentru majoritatea altor specii de mamifere studiate.

Din figurile 5 și 11 se constată conținutul procentual al fracției cu reasociere moderat rapidă (zeci de mii de copii) oscilează nesemnificativ – în jurul valorii de 12-13%, iar la 75% dintre specii, acesta este egal cu 10-15%. După conținutul absolut de ADN, însă, această fracție se schimbă strict în raport cu schimbarea dimensiunii genomului (fig. 13).

Pentru fracția de repetiții intermediare (cu o frecvență medie de repetiție egală cu 400) după conținutul relativ, în genomul mamiferelor, nu s-a putut găsi vreo legitate: în raport cu conținutul său absolut în genomul mamiferelor, se poate spune că oscilează într-un interval mic de valori, în jurul valorii de 11pg (la 70% din speciile studiate, variațiile fiind în limitele de la 0,7 la 1,3 pg) și nu se corelează deloc cu dimensiunea genomului mamiferelor (fig. 13). Astfel, după cum se vede, în evoluția mamiferelor nu se schimbă proporția secvențelor repetitive, existente în genom în medie

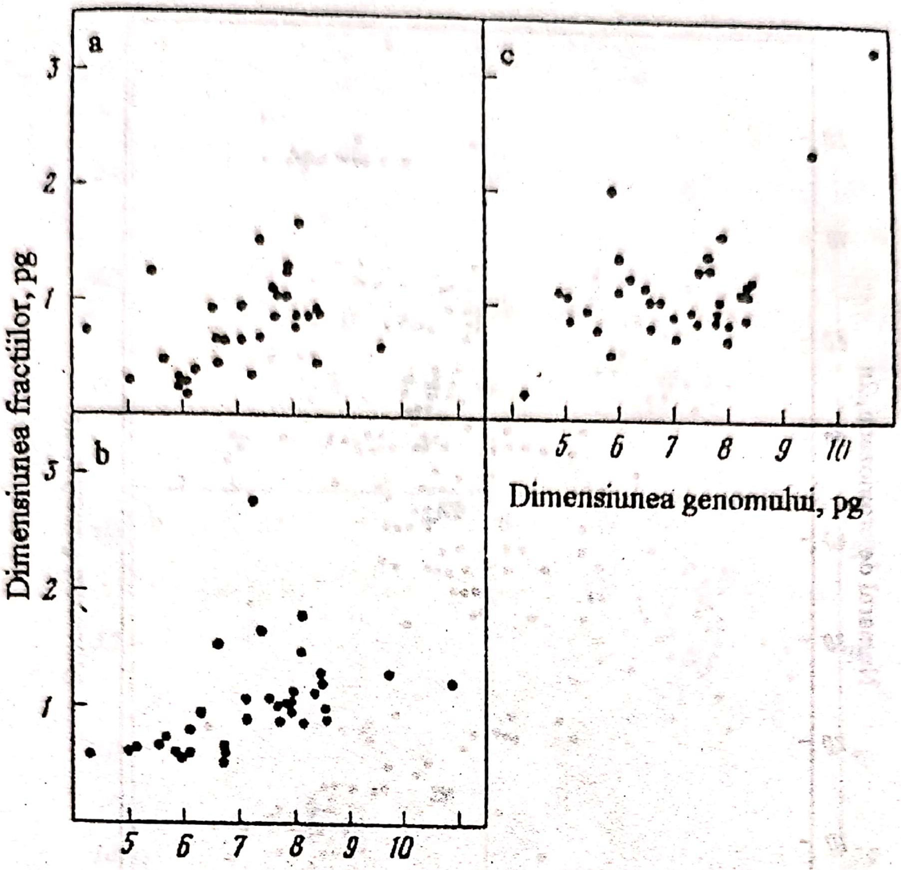


Fig. 13 — Raportul de corelație dintre dimensiunea genomului și conținutul ADN în fracția foarte rapidă (a), fracția rapidă (b) și fracția intermediară (c) la mamifere (A. Ginatulin, 1984)

50 mii de copii, și în același timp, se schimbă foarte puțin și conținutul absolut al succesiunilor, ce se repetă în medie de 400 de ori.

Pentru clarificarea posibilei legături între dimensiunea genomului și numărul de cromozomi, în figura 14 se prezintă pe abscisă - dimensiunea genomului (2C), iar pe ordonată – numărul diploid de cromozomi, conform datelor lui Matthey (Matthey, 1973), Orlov (Orlov, 1974) și Pellicciari (Pellicciari și colab., 1982).

După cum se vede, corelația între mărimile comparabile lipsește. Nu există corelație nici între 2n și cantitatea de ADN, în fiecare din cele patru fracții de ADN la mamifere (fig. 15). Posibil, dacă în locul numărului de cromozomi se lua numărul de brațe cromozomale, atunci putea fi evidențiată o oarecare corelație. Această presupunere se bazează pe faptul că adesea, la mamifere, mărirea numărului de brațe cromozomale este condiționată de apariția blocurilor suplimentare de heterocromatină în comparație cu

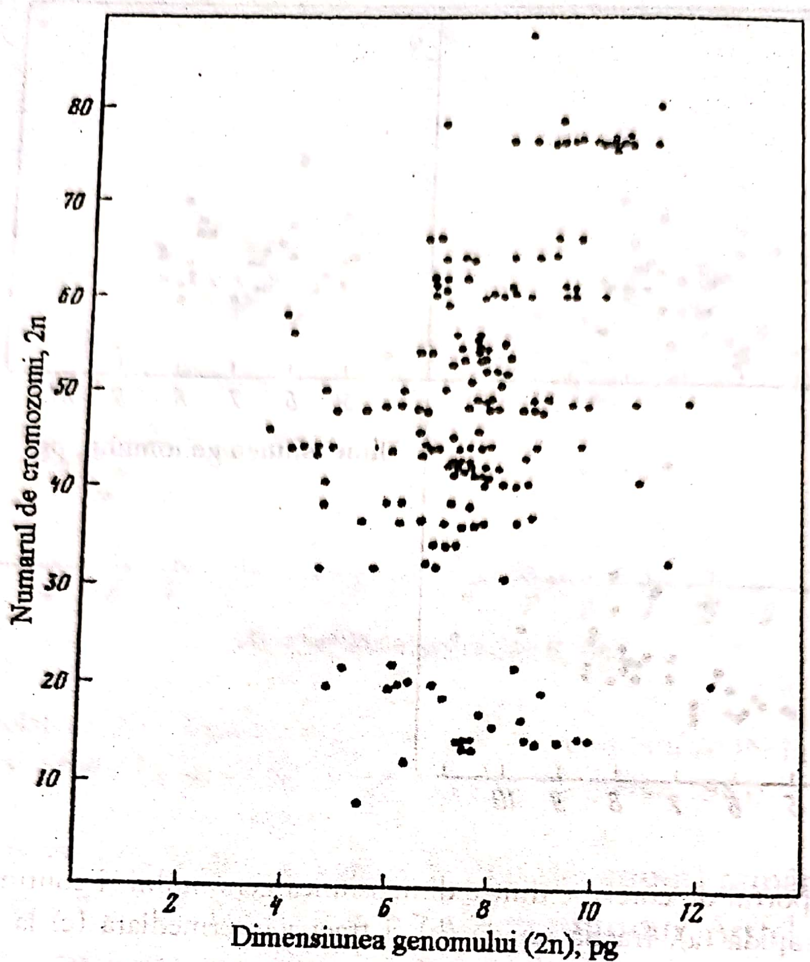


Fig. 14 — Relația dintre dimensiunea genomului și numărului diploid de cromozomi la mamifere (A. Ginatulin, 1984)

cromozomii speciilor înrudite, iar creșterea heterocromatinei în cromozomi, în majoritatea cazurilor, este însoțită de mărirea dimensiunii genomului.

Cercetările noastre (Lungeanu, Gavrilă, Stepan și Murariu, 1984) efectuate la *Micromys minutus* au descris cariotipul acestui gen monospecific din fauna României care are 2n = 68 (66 autozomi și heterozomii XX, la femelă și XY, la mascul) cei mai mulți fiind acrocentrici (perechile 1-4 metacentrici; perechile 5, 6 submetacentrici și restul acrocentrici). Cromozomul X este cel mai mare acrocentric al complementului, comparabil dimensional cu metacentricii primei perechi. Multitudinea acrocentricilor sugerează o posibilă evoluție cariotipică pe calea fuziunilor centrice.

Investigații mai laborioase au fost efectuate în cadrul speciei *Microtus epiroticus*, la care Gavrila și colaboratorii (1986) au evidențiat o situație

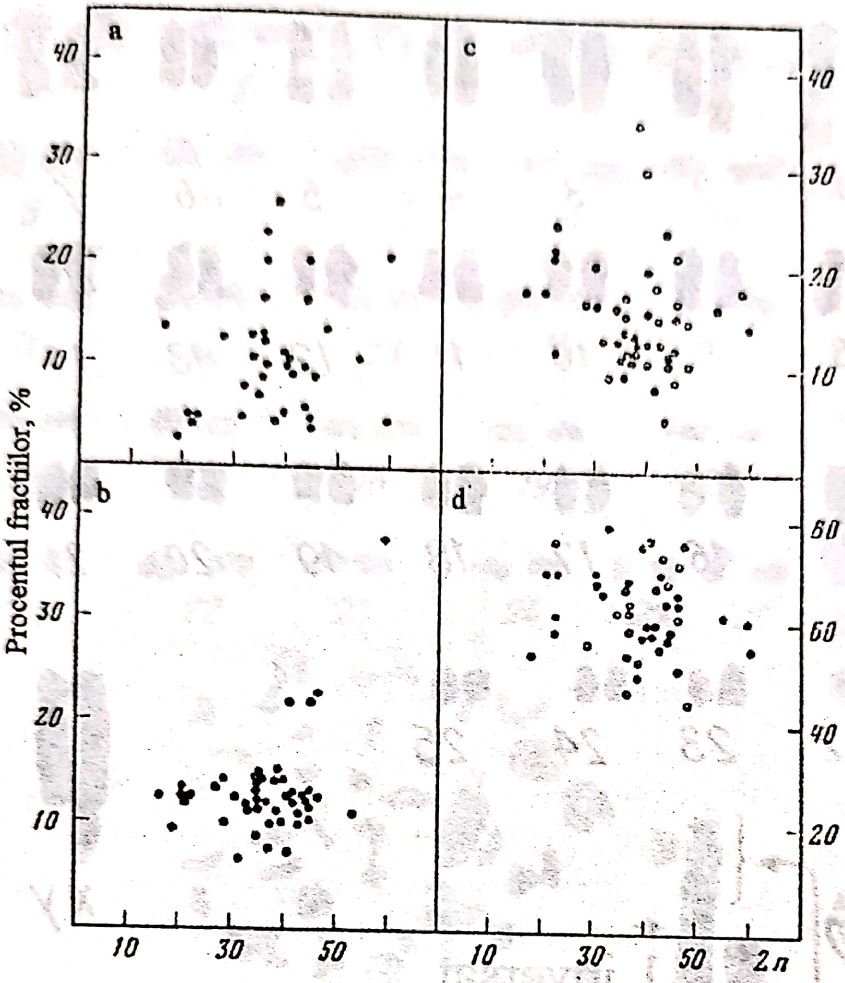


Fig. 15 — Relația dintre numărul diploid de cromozomi și proporția fracției foarte rapide (a), proporția fracției rapide (b), proporția fracției intermediare (c) și proporția fracției lente de ADN la mamifere (A. Ginatulin, 1984)

interesantă printre mamifere și anume dimensiunea enormă a heterozomilor, cromozomul X fiind cel mai mare cromozom al complementului, pe când cromozomul Y egalează dimensional cromozomii primei perechi. In cadrul acestor investigații a fost decelat și un caz de pseudodiploidie, la un exemplar femel, colorația diferențiată permițând și identificarea mecanismului genezei primei perechi de cromozomi și anume cel al realizării unei inversii pericentrice la perechea 1 de cromozomi care duce la polimorfismul perechii respective, prin formarea unui cromozom biarmat identificat prin bandare G (Fig. 16).

Utilizând metoda de bandare C a fost descrisă cromatina constitutivă, evidențiind aspecte tipice ale heterocromatinizării în procesul de compensație a dozajului genelor din cromozomul X (lionizare) (Fig. 17).

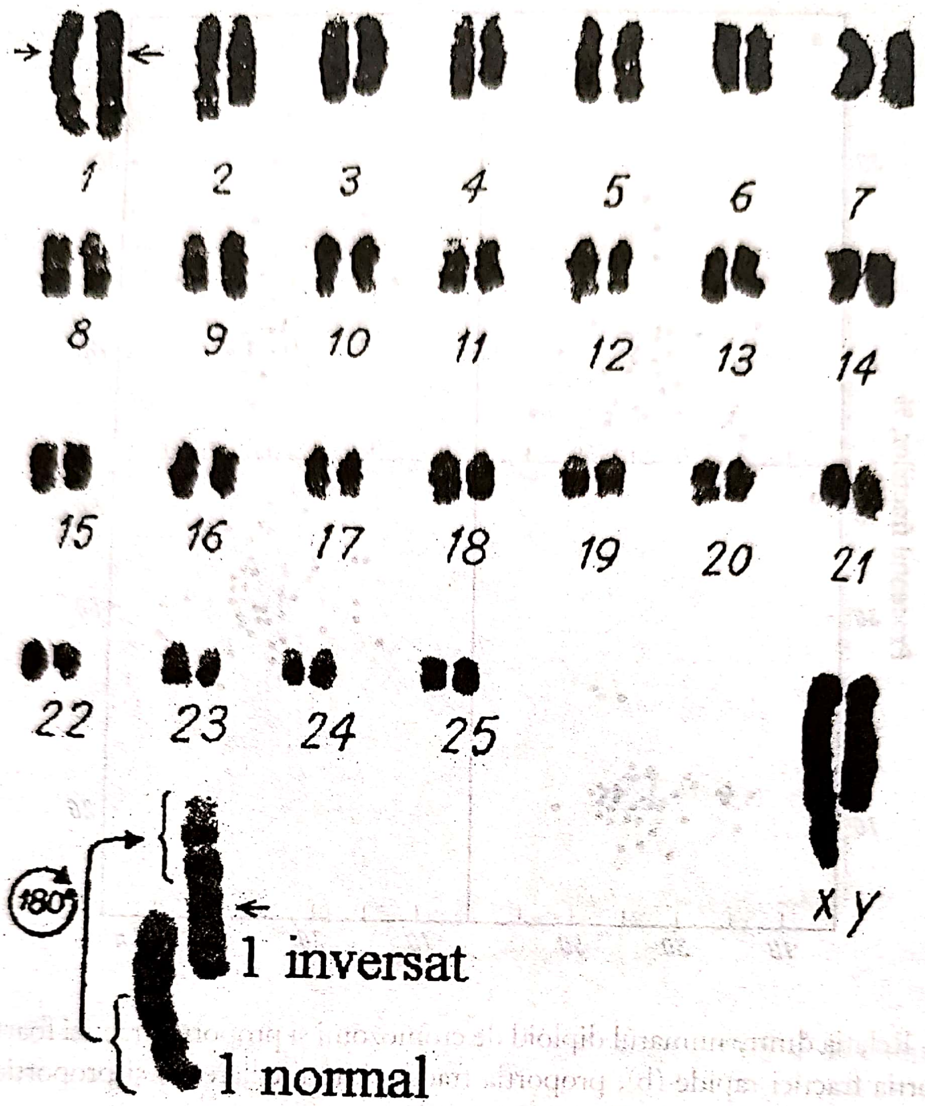


Fig. 16 — Cariotip pseudodiploid bandat C la *Microtus epiroticus* (2n=54, XY)((original Lungeanu, Gavrilă, Stepan, și Murariu, 1985).

Cercetările lui Verganian și Papoyan (1964) au evidențiat la hamsterul cenușiu din Armenia, *Cricetulus migratorius* (2n=22, XX♀ și XY♂), izomorfia cromozomilor de sex, heteromorfismul perechii 8 de autozomi, precum și asociații tetramerice (Fig. 18) la această specie, cea ce reflectă, în opinia autorilor, originea „recentă” a acestor specii, precum și poziția taxonomică tranzitorie, în cadrul grupului. Analiza, comparativ cu hamsterul chinezesc, denotă faptul că în cursul speciației, doar perechea 4 de cromozomi și-a păstrat caracteristicile amestecate, dar se exclude posibilitatea intervenției mecanismelor robertsoniene în acest proces.

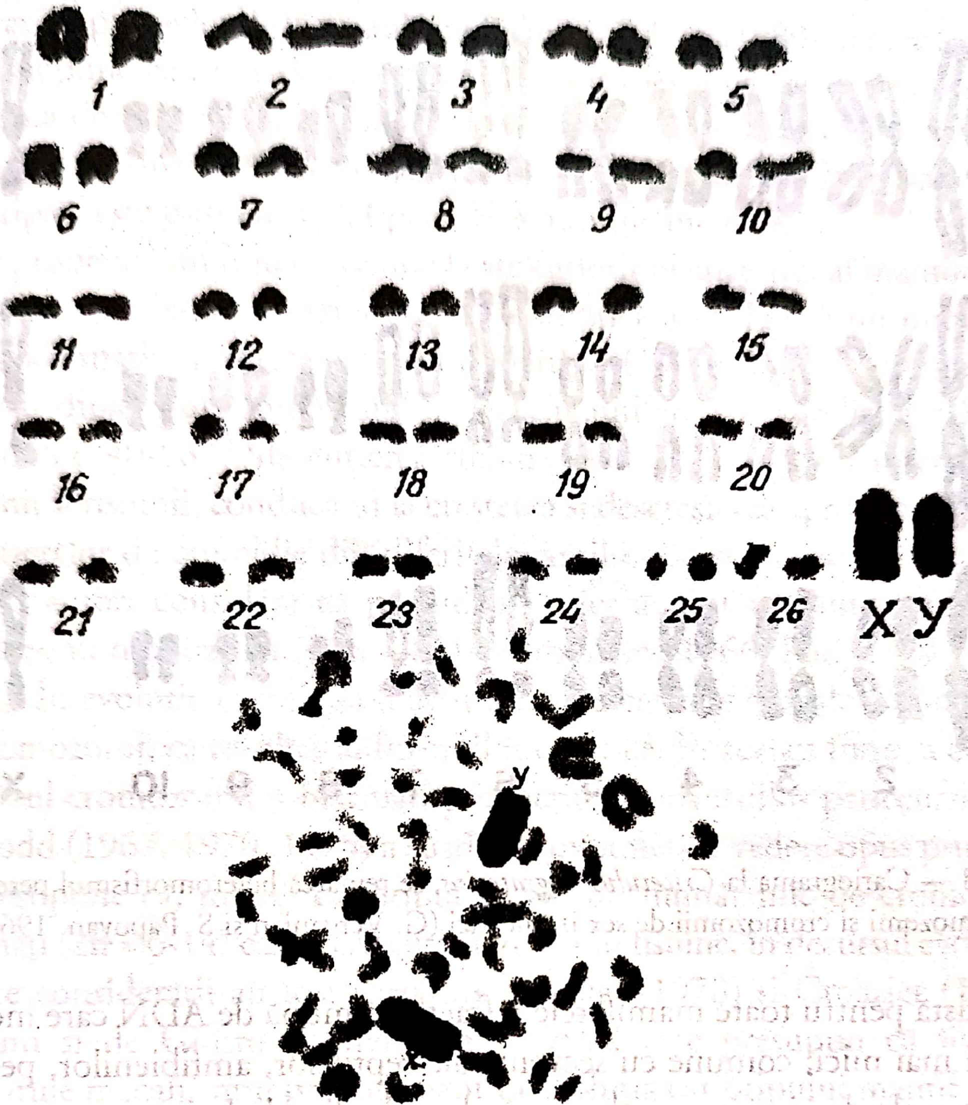


Fig. 17 — Cariotipul bandat C și cariograma la *Microtus epiroticus* (2n=54, XY). Se remarcă heterocromatinizarea integrală a cromozomului Y și parțială a cromozomului X (original Lungeanu, Gavrilă, Stepan, și Murariu, 1985)

Izomorfismul heterozomilor sugerează derivarea cromozomului Y din cromozomul X printr-o formă oarecare de diferențiere secundară care a afectat doar porțiunile distale ale brațului lung al cromozomului Y. Absența organizatorului nucleolar din cromozomul Y îl diferențiază totuși de cromozomul X.

Un aspect definitoriu al evoluției complementului cromozomal la mamifere este existența polimorfismului cromozomal interspecific și intrapopulațional, dovadă că speciile de mamifere sunt încă în formare.

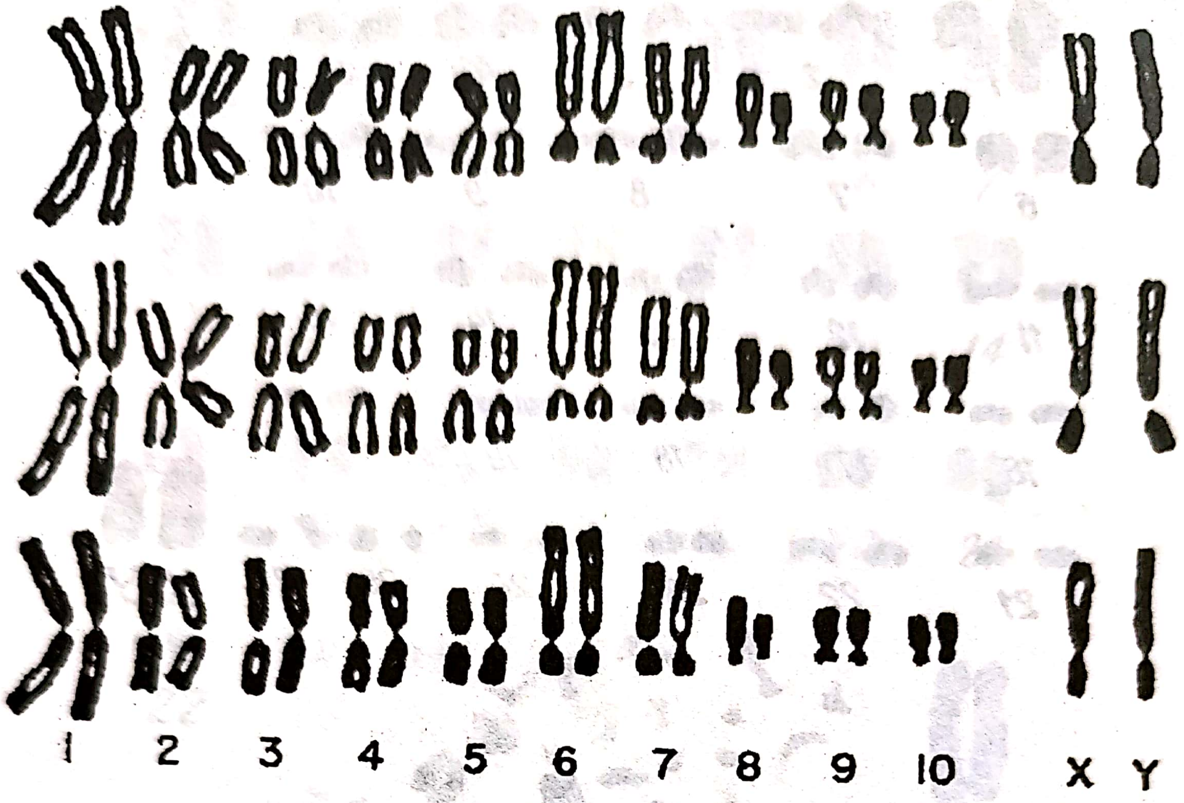


Fig. 18 — Cariograma la *Cricetulus migratorius*, se remarcă heteromorfismul perechii 8 de cromozomi și cromozomii de sex izomorfici (G. Verganian și S. Papoyan, 1964).

Există pentru toate mamiferele o fracție comună de ADN care include fracții mai mici, comune cu secvențe ale reptilelor, amfibienilor, peștilor etc. grupele de viețuitoare, descinzând unele din altele, păstrează, pentru sute de milioane de ani, secvențe genice comune, neschimbate (Britten și Kohne, 1969; Davidson și Britten, 1979).

Alterările evolutive ale cariotipului la mamifere, care duc la schimbări ale numerelor diploide de cromzomi și ale numărului de brațe cromozomale, sunt produse, în special, prin fuziuni, fisiuni, inversii pericentrice și modificări în segmentele heterocromatice. Wilson și colaboratorii (1975) au estimat că rata evoluției cariotipului mamiferelor este între 1 și 10 schimbări într-o familie, în decurs de 1000 de milioane de ani. Mamzama și Imai (1981) au apreciat că există o schimbare a numărului diploid sau NF (număr fundamental de brațe cromozomale), în medie, o dată la 2,5 milioane de ani. Rata evoluției cariotipului, în diferite grupuri, este considerată a fi relativ constantă, de către autorii amintiți. Această concluzie contravine punctelor de vedere ale lui Baker și Bickam (1980), însă se bazează pe presupunerea că ratele divergențelor speciației sunt constante, precum și durata de existență a speciilor. Dar, se pare că nu aceasta este situația. În studiul lui Imai și colaboratorii (1983), timpul în care are loc o schimbare cariotipică este estimat la 2,2 până la 5,5, milioane de ani.

O problemă mult mai discutată este cariotipul ancestral al mamiferelor și tendința de bază care conduce la diferențierea sa. Există un număr de soluții alternative la acestă problemă. Matthey (1976) consideră că numărul original diploid al cromozomilor de la mamifere s-a stabilit la valoarea modală de 40-56. Diferențierea trebuie să fi avut loc prin intermediul fuziunii și fisiunii, conducând la creșterea și descreșterea aproximativ egală a numerelor de diploidie din diferitele familii.

Alți autori consideră că primul mamifer a avut un număr mare de cromozomi monoarmați (2n = 80) (Vorooncov, 1966; Radjabli și colab., 1978). În evoluție trebuie să fi avut loc o descreștere globală a numărului de cromozomi, ca rezultat al fuziunilor centrice. În același timp, a crescut numărul cromozomilor biarmați prin acțiunea inversiilor pericentrice.

Todd (1967, 1970, 1975) a susținut un punct de vedere opus prin care se presupune că, inițial, cariotipul a avut un număr mic de cromozomi biarmați (2n = 6-14) care a crescut ulterior prin fisiune, în decursul evoluției. Aceste considerații au fost sprijinite de Imai (1978) și Croazier (1980), precum și de Giusto și Margulius (1981), care presupun că fisiunea constituie mecanismul predominant în evoluția cariotipului mamiferelor.

În evoluția cariotipului sunt implicați cinci factori:

- un mediu celular care să conducă la fragmentarea cromozomală;
- fragmentarea cromozomală trebuie să apară în poziții în esență nefuncționale;
- rearanjamentele cromozomale sau adițiile trebuie să fie compatibile cu rigorile mitozei și meiozei;
- rearnajamentele sau adițiile trebuie să furnizeze complexe de gene adaptative;
- sistemele de încrucișare să asigure supraviețuirea.

Fragmentarea spontană a cromozomilor a fost evidențiată atât la plante cât și la animale, adesea fiind asociată cu controlul hibridării. Heterocromatina joacă un rol important în fragmentarea cromozomală. Unele fragmentări pot genera noi rearanjamente care, depășind rigorile meiozei, pot fi ulterior testate de mediu și selectate. Virusurile, bacteriile și alți agenți patogeni pot cauza rupturi cromozomale și prin aceasta, s-au constituit de-a lungul timpului în factori ai evoluției organismelor eucariote.

Pentru rearanjamentele cromozomale, orice fragmentare, cu excepția celei de la nivelul centromerului, trebuie să se realizeze la nivelul unei porțiuni nefuncționale a materialului genetic sau, în cazul în care fragmentarea apare la nivelul unui cistron funcțional, o copie funcțională a acelui cistron trebuie să se găsească în genom, aceasta fiind condiția pentru ca rearanjamentul respectiv să supraviețuiască și să se perpetueze, putând să fie menținut în condiție homozigotă.

Succesul fragmentărilor și al rearanjamentelor cromozomale depinde în mare măsură de prezența secvențelor de ADN repetitiv care constituie un sistem neadaptat, substratul material pentru schimbările ulterioare.

Cariotipurile caracterizate ca fiind „conservative” își datorează această trăsătură cantității foarte reduse sau chiar absenței heterocromatinei constitutive care este reprezentată, de fapt, de ADN repetitiv. Taxonii care au cariotipuri conservative au foarte puțin ADN repetitiv sau, dacă acesta este prezent într-o cantitate mai mare, el este localizat în aproximativ aceleași poziții în cei mai mulți cromozomi ai complementului, astfel că interschimburile vor fi nedetectate decât în cazul efectuării unor analize citogenetice și moleculare. Excepție de la această regulă generală sunt cistronii din regiunea organizator nucleolară, care conțin gene pentru ARNr, cistronii constituiți din secvențe de ADN înalt repetate la cea mai mare parte a organismelor.

Evoluția cariotipului, legată de speciație și de apariția unităților taxonomice transpecifice, începe să capete o explicație mai adecvată atunci când datele citologice sunt coroborate cu cele de evoluție moleculară și ecogenetică . Dar o teorie unitară bine cristalizată lipsește în acest domeniu, deși în ultimii ani s-au elaborat multe lucrări cu principii generalizatoare (John și Levis, 1966; Stebbinus, 1966; White, 1968, 1969).

CAPITOLUL XXXVII

GENOM SUIN (PORCIN), GENOM BOVIN ȘI GENOM CANIN

1. INTRODUCERE

Analiza genomului animalelor domestice pentru cunoașterea determinanților genici ai diverselor caracteristici cu impact economic, precum și pentru înțelegerea modului cum au evoluat mamiferele, constituie unul din scopurile dificil de atins ale geneticii.

Primul obiectiv din analiza oricărui genom este reprezentat de cunoașterea distribuției genelor în fiecare cromozom și a distanței dintre ele.

Aflarea poziției în cromozomi a diferiților loci este urmată de indicarea acestora sub forma unor reprezentări grafice liniare denumite hărți cromozomale. Fiecare cromozom al unei specii își are harta sa genică . Întocmirea hărților cromozomale constituie procesul de cartare sau cartografierea genică. Hărțile genice sunt în curs de elaborare la aproximativ 30 de specii (O'Brien și colab., 1993), dar ele se găsesc în diverse faze de cartare, eforturile orientându-se în ultimul timp spre speciile de animale cu importanță economică: porcul, vaca, oaia.

La animalele domestice, într-o primă etapă, este necesară realizarea unui schelet al hărții prin acoperirea genomului cu markeri polimorfici situați la intervale regulate. De exemplu, la oaie (*Ovis aries),* 200 de markeri sunt suficienți pentru ca în 96% dintre cazuri, oricare din acești markeri să segrege cu o genă de interes economic pentru un caracter cantitativ productiv (**QTL**-*quantitative trait loci*) (Broad și Hill, 1994). Markerii reprezintă puncte de reper, cu poziție bine stabilită în cromozomi, ei asigurând împărțirea cromozomilor în fragmente bine și precis delimitate. În a doua etapă, acest schelet este utilizat pentru a obține o hartă de rezoluție mai mare. Urmează apoi cea de a treia etapă care constă în secvențializarea nucleotidică a genelor clonate.

2. HARTA CROMOZOMALĂ LA PORC *(SUS SCROFA)*

Construcția hărților genetice și fizice la porc este scopul proiectului european **PiGMaP** (**Pi**g **G**ene **Ma**pping **P**roject), care este o parte a programului BRIDGE al Comunității Economice Europene. Proiectul a fost inițiat în anul 1989 și include 16 laboratoare din 8 țări europene, iar din anul 1993 și laboratoarele din SUA, Australia și Japonia.

Complementul genetic la porc cuprinde 18 perechi de autozomi plus cei doi cromozomi de sex (X și Y). Întregul genom cuprinde 3 x 10^9 perechi de baze.

Numărul de gene cartate în genomul porcin a fost de 35 în anul 1985 (Lalley și McKusicK), 40 în anul 1989 (Lalley și colab.) și de 84 în anul 1991. Începând cu anul 1984, situația cercetării la porc a fost publicată de G. Echard în Genetic Maps.

În harta genetică publicată în anul 1992, Echard și colaboratorii au raportat cartarea a 84 de loci, iar genele respective au fost distribuite în 17 cromozomi. În cromozomii 11, 17 și 18, încă nu au fost cartate gene.

Prima hartă de lincaj a porcului, bazată pe intercross-uri între scroafe din rasa *Large White* și vieri sălbatici europeni, a fost publicată în anul 1994 și acoperă 1800 cM (centiMorgani) din genomul porcin, cu un spațiu între markeri de 11 cM. Folosind această hartă, autorii au estimat că dimensiunea genomului porcin este de aproximativ 2800 cM, deci mult mai mică decât la om și aproape similară cu cea de la șoarece (Ellegren și colab., 1994).

Prima cartare a unor loci cantitativi pentru creșterea și depunerea grăsimii la porc a fost efectuată de Anderson și colaboratorii, în anul 1994, stabilind că, în cromozomul 4 de la această specie, există o regiune unde sunt grupați acești loci.

În anul 1995, consorțiul PiGMaP a prezentat prima sa hartă citogenetică cu 145 loci, rezultată din colaborarea laboratoarelor europene.

3. STUDII CITOGENETICE LA FAMILIA *BOVIDAE*

Pe baza criteriilor taxonomice, cele trei specii domestice ale familiei ***Bovidae*** au fost grupate în 2 subfamilii diferite: *Bovinae* (vite), și *Caprinae* (oi și capre)

Din punct de vedere al cariotipului, pe baza bandărilor GTC și RBA, cele trei specii sunt foarte asemănătoare, au același număr de brațe cromozomale (NF=58), apărând unele diferențe minore, la unii autozomi (cromozomul 9) și la cromozomii de sex. În cele mai multe cazuri, s-a realizat o asociație între omologia benzilor cromozomale și asemănările în conținutul de gene. La speciile mai îndepărtate din punct de vedere evolutiv, această relaționare nu este chiar atât de evidentă.

S-au realizat experimente de localizare a genei *glucozo-fosfat-isomerazei (GPI)* prin hibridizare in situ la cele trei specii. Această genă s-a constatat a fi localizată în cromozomul 18 (la vite), 14 (la oi) și 18 (la capre), în zona q22–q24. Acești trei cromozomi au pattern-uri de bandare similare ca și semnale de hibridizare asemănătoare, dacă se utilizează probe ADN GPI8R (Chowdhary și colab., 1991).

Analiza cromozomilor bandati RBG, de la cele trei specii a evidențiat faptul că autozomul 9 apare identic la oi și la capre, el diferind însă, de cel de la vite. S-a observat că regiunea centrală a cromozomului 9, pal colorată, este mai redusă la vite decât la oi și capre, și că numărul de benzi dispuse sub aceasta regiune este mai mare la capre și oi decât la vite; în timp ce

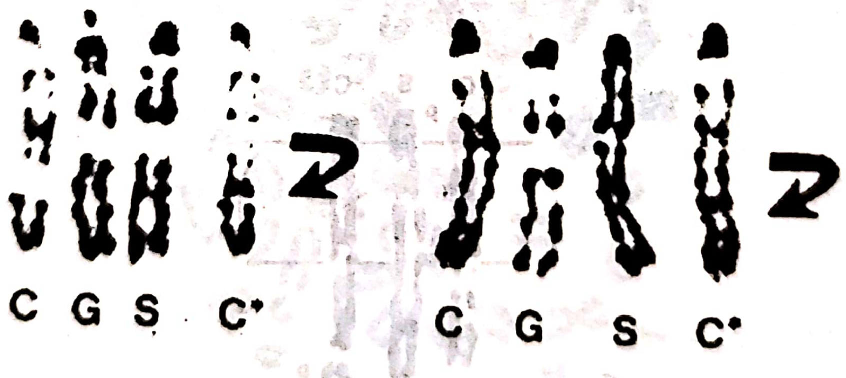


Fig. 2 Compararea cromozomului 9 bandat RBG (***R** bands by **BrdU** suing Giemsa stain*) de la vite (G), oi (S), capre (C). Inversia paracentrică din autozomul 9 este indicată prin săgeată. C* reprezintă autozomul 9 cu regiunea centrală inversată (după Hayes și Petit, 1991)

numărul benzilor de deasupra este mai redus la oi și capre. De aici, s-a tras concluzia că, la un moment dat, în momentul divergenței între *Bovinae* si *Caprine,* a avut loc o inversie paracentrică (fig. 2).

Studiul cromozomilor de sex bandați RBG a evidențiat că și în cazul cromozomului Y se întâlneste aceeași situație și anume, cromozomii Y de la oi și capre sunt asemănători, foarte mici, acrocentrici, iar cei de la vaci sunt submetacentrici. Aceleași constatări sunt valabile și pentru cromozomul X, cu mențiunea ca s-a constatat că, o parte a bratului q al cromozomului X de la oi și capre se aseamănă puternic cu bratul q al cromozomului X de la vaci dar, în formă răsturnată, aceasta fiind încă o dovadă a apariției inversiei paracentrice. De asemenea, pe baza pattern-ului de bandare, s-a constatat că o porțiune a cromozomului X este comună la toate cele 3 specii, ceea ce susține ipoteza potrivit căreia cromozomul X s-a conservat aproape în totalitate de la un strămoș comun, la multe din speciile de mamifere.

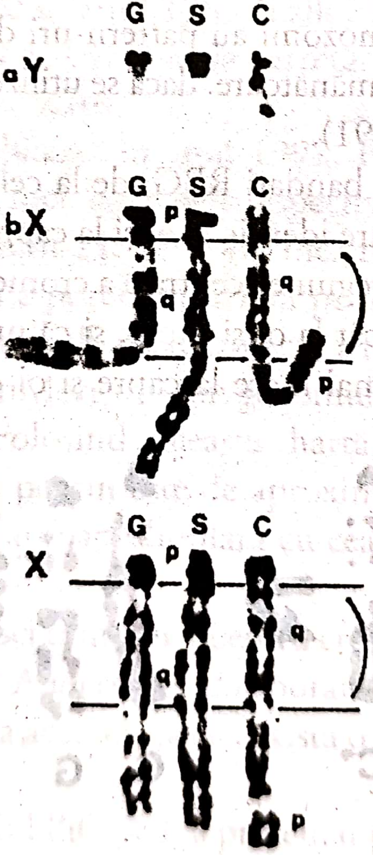


Fig . 3 — Compararea cromozomilor de sex bandați RBG de la vite (G), oi (S), capre (C): a) Y, b) X. Regiunea comună a cromozomul X, întâlnită la toate cele trei specii este indicată de paranteze (după Hayes și Petit, 1991)

Cercetările asupra relatiilor filogenetice între cele două subfamilii de Bovidae s-au continuat și cu secvențierea ADN mitocondrial de la ovine și compararea cu ADNmt de la bovine.

Studiile s-au realizat pe speciile *Ovis aries* și *Bos taurus*, stabilindu-se că gradul de divergență de secvență între cele 2 specii este de 16,4%, calculat din compararea hărților de restricție. Pe baza acestor date se poate concluziona că oile și vitele au evoluat dintr-un ancestor comun, acum 7.7–16.4 x 10^6ani.

4. ANOMALII CROMOZOMALE:

La capre s-au realizat studii pe hibridul *Murciana-Granadina.*

Cariotipul normal al acestuia are 2n=60 cromozomi. Cu excepția cromozomului Y, care este cel mai mic și este singurul metacentric, toți ceilalți cromozomi sunt acrocentrici.

Studiile asupra incidenței anomaliilor cromozomale au permis identificarea unui număr redus de fuziuni centrice, și a unui caz de ruptură cromozomală. Toți purtătorii erau normali din punct de vedere fenotipic.

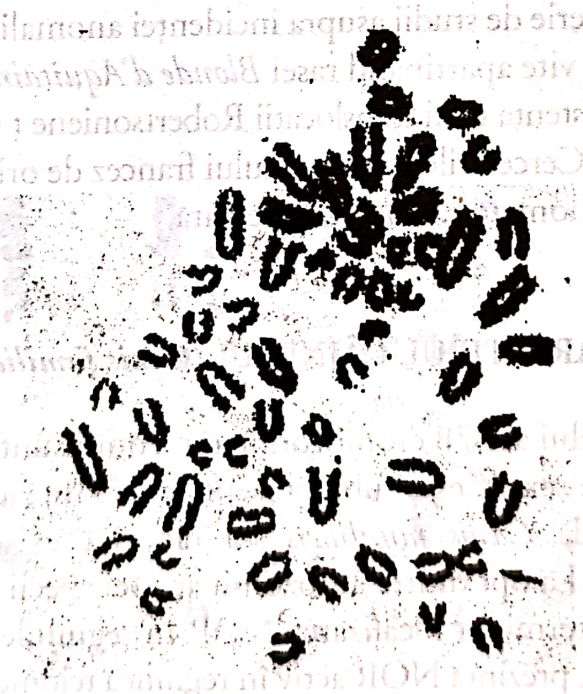


Fig.4 — Cromozomi metafazici la o femelă a rasei *Murciana-Granadina,* purtătoare a unei fuziuni centrice (săgeată) (după Burguete, 1991)

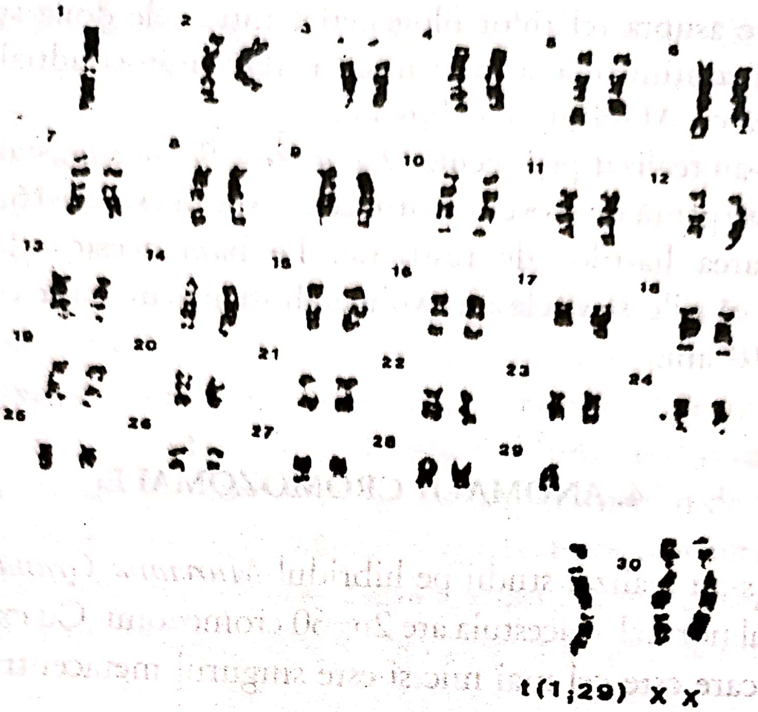


Fig 5 — Cariotip bandat GTG la femelă din rasa *Danish Blonde d'Aquitaine*, prezentând translocație Robertsoniană t (1/29) (după Hansen și Hansen, 1991)

S-au realizat o serie de studii asupra incidenței anomaliilor cromozomale și în populațiile de vite aparținând rasei *Blonde d'Aquitaine* din Danemarca și s-a descoperit existența unei translocații Robertsoniene t (1/29), la femelele acestei rase (fig.5). Cercetările geneticianului francez de origine română Paul Popescu, în acest domeniu, sunt de referință.

5. CARIOTIPUL CÂINELUI *(Canis familiaris)*

Genomul câinelui are 78 cromozomi, autozomii sunt toți acrocentrici, iar cromozomii de sex: X este submetacentric și Y metacentric.

În cariotipul de *Canis familiaris* s-a raportat existența NOR și a asociațiilor NOR. La opt dintre autozomii acestei specii (5, 8, 14, 16, 19, 21, 32, 37) s-a determinat localizarea NOR în regiunile telomerice.

Cromozomul X prezintă NOR activ în regiunea telomerică (Xq), într-un număr redus de cazuri, dar nu s-a evidențiat existența asociațiilor NOR.

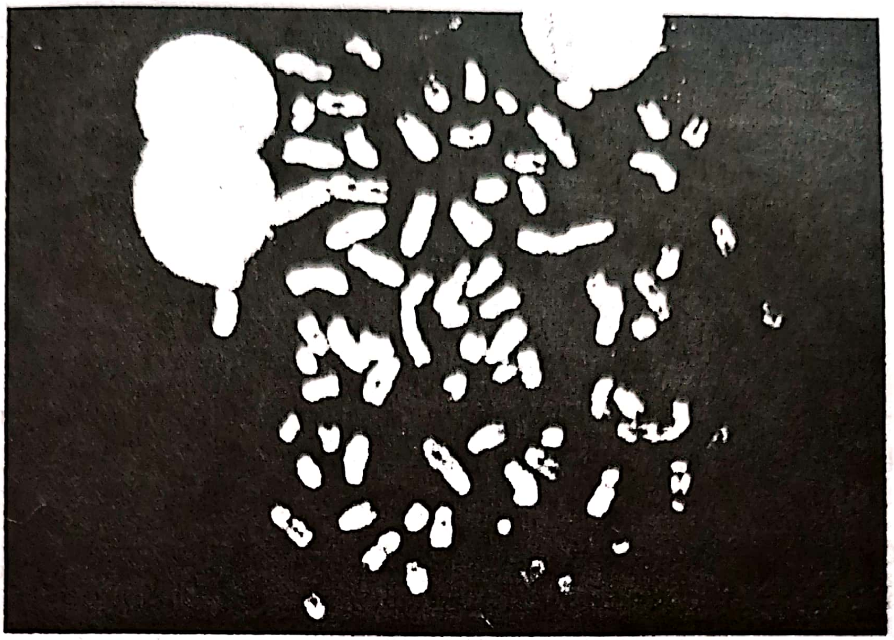


Fig. 6 — Cromozomi metafazici la masculul de *Canis familiaris* (după Moreno – Millan, 1991)

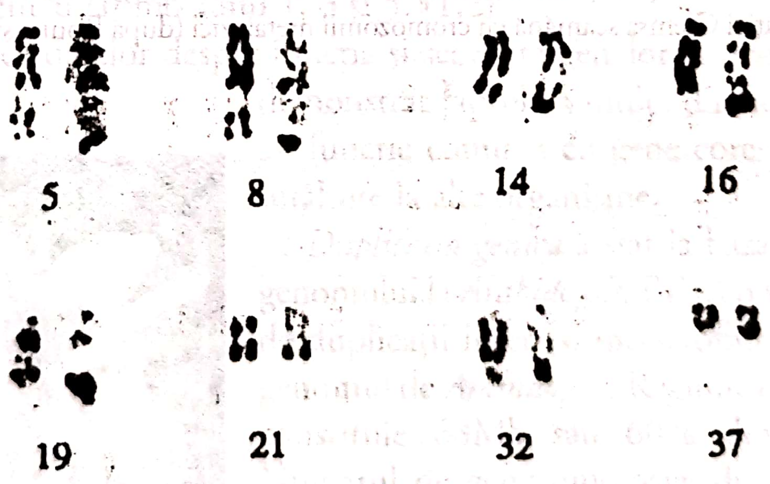


Fig. 7 — Cei opt autozomi de la câine care poartă NOR-uri active, evidențiați prin tehnica FpG în stânga și respectiv, marcarea cu Ag a NOR în dreapta (după Ronne și colab., 1991)

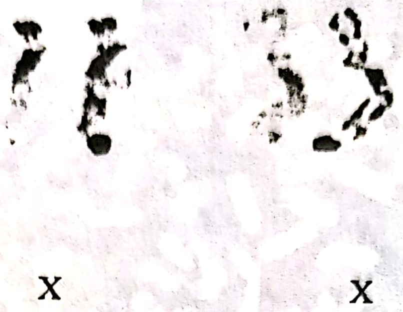


Fig. 8 — Cromozomul X prezentând marcaj cu Ag a NOR, în regiunea telomerică a brațului lung (după Ronne și colab., 1991)

În mare parte dintre cazuri, regiunile NOR sunt asociate, la nivelul autozomilor cu o rata de 1–3 asociații per metafază. Cromozomii care se asociază cel mai des, la nivelul NOR sunt cromozomii 14, 16.

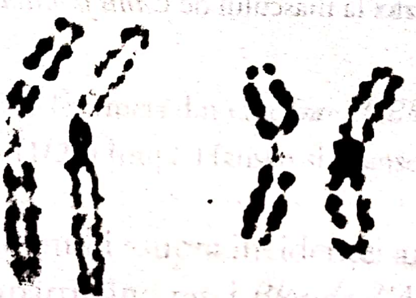


Fig. 9 — NOR-un tipice pentru cariotipul de la câine (dreapta); când cromozomii sunt supuși colorației Giemsa seamănă cu cromozomii metafazici (după Ronne și colab., 1991).

CAPITOLUL XXXVIII

MODELUL GENOMIC – *ARABIDOPSIS THALIANA*

Arabidopsis thaliana reprezintă un sistem model pentru identificarea genelor și determinarea funcției acestora. *A.thaliana* prezintă avantajul că are un genom relativ mic, număr mare de descendenți și mărime redusă. Aceste avantaje au stârnit interesul cercetătorilor pentru determinarea proceselor biologice ale acestei plante precum și caracterizarea multor gene (figura1)

Astfel, s-a inițiat pentru realizarea acestor obiective în anul 1996, un program — ***Arabidopsis* Genome Initiative** — cu grupuri de cercetători din mai multe țări. Primele rezultate în ceea ce privește secvențierea genomului la *Arabidopsis* au fost comunicate în Decembrie 1999, când au fost publicate listele de secvențe ale cromozomilor 2 și 4, iar în Decembrie 2000, cele pentru cromozomii 1, 3 și 5. (1,2)

Acumularea datelor despre funcția și secvența genelor la *Arabidopsis* a demonstrat faptul că multe din aceste gene au funcție comună cu gene corespondente întâlnite la alte organisme.

Duplicația genică a stat la baza evoluției genomului la *Arabidopsis.* Există o scară largă de duplicații inter- și intracromozomale în genomul de *Arabidopsis.* Regiunea duplicată constituie 68Mb sau 60% din genom. Numărul de gene omoloage din regiunile duplicate variază considerabil între 20–50% și sunt reprezentate de duplicații în tandem.(figura 2)

Fig. 1 — *Arabidopsis thaliana*

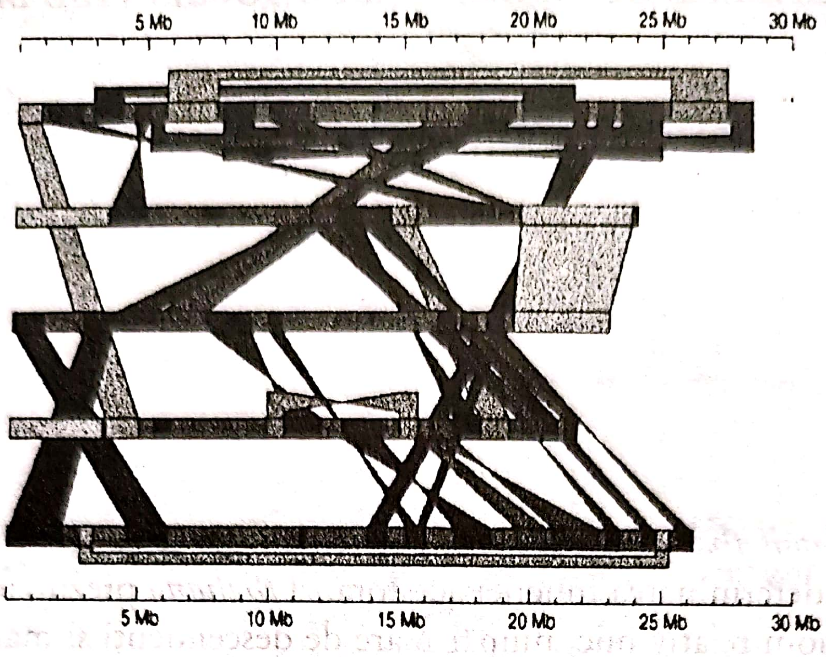


Fig. 2 — Reprezentarea schematică a duplicațiilor genice la *Arabidopsis*

Genomul conține aproximativ 25498 de gene ce codifică pentru proteine ce aparțin la 11000 de familii similare ca funcție cu cele de la *Drosophila* și *Caenorabditis elegans*, dar și cu alte organisme eucariote. Au fost însă descoperite și alte familii de proteine specifice acestei plante. Multe dintre genele identificate se întâlnesc și la om. De asemenea, 50% din ADN cromozomal este acoperit de gene. Aproximativ 20% dintre gene sunt lipsite de introni, iar genomul include gene de mărimi diferite.

O problemă majoră în ceea ce privește secvențele genomice este modul în care sunt distribuite regiunile codificatoare față de secvențele intergenice, necodificatoare, și introni.

Cunoașterea când și unde produșii genici (ARN și/sau proteine) sunt exprimați poate furniza soluții importante privind funcția biologică a acestora.

Cromozomii au regiunea centromerică heterocromatinizată, iar pentru secvențierea acestora a fost nevoie de 1569 de *BAC*-cromozomi artificiali de bacterie, *TAC*-cromozomi artificiali competent-transformați de bacterie, cosmide și clone *P1*(fagi); 22 de produși PCR au fost amplificați direct din ADN-ul genomic și secvențiați.

Secvențele telomerice au fost obținute utilizând cromozomi artificiali de drojdie *(YAC)* și clone de fagi, precum și produși *IPCR*-adică invers PCR.(3,4)

Familiile de gene prezintă structuri aproximativ similare cu cele de *Drosophila* și *C.elegans*, și sunt reprezentate de **repetiții în tandem**.

Analiza genomului la *Arabidopsis* relevă 1528 aranjamente în tandem ce conțin 4140 gene individuale (~ 17%). Au fost identificate și multe segmente duplicate de gene. Au fost identificate 24 segmente duplicate de ~ 100kb sau mai mari, reprezentând ~ 58% din genom. Tot elemente duplicate au fost identificate și la nivelul centromerului (~ 375kb) cromozomului 4.

Duplicațiile genice identificate în genomul speciei *Arabidopsis thaliana* au demonstrat că această specie își are originea într-un ancestor comun. Observațiile că segmentele duplicate sunt dispersate în genom sunt în concordanță cu ipoteza că rearanjamentele cromozomale pot avea un rol important stabilizarea genomurilor poliploide la plante (11,12). Duplicațiile reprezentate în figura 3 relevă originea ancestrală a acestei specii. Aceleași duplicații sunt prezente și în genomul speciei *Brassica oleracea*, demonstrând originea comună a celor două specii. Analiza genelor de pe cromozomul 4 neconservate în segmentele cromozomului 5, indică că trei gene *(at4g17260, at4g17540* și *at4g17590)* au omologie și sunt dispersate de-a lungul genomului, sugerând astfel că pot avea loc translocații la nivelul anumitor gene (12). Un cluster genic reprezentat de trei gene: *at4g17380, at4g17381, at4g17340*, prezintă omologie pe cromozomul 4, sugerând că aceste aranjamente scurte, netandemice, au avut loc în evoluție.

Toți cei 5 cromozomi au fost aliniați, fiecare având 1000 bp în lungime, cu 50% identități. Câțiva cromozomi conțin gene foarte mici ce codifică pentru proteina *L41* a complexului ribozomal 60S, cu numai 25 aminoacizi. Cromozomii 1–4 au fost aranjați în ordinea descreșterii lungimii. Cromozomul 5 nucleolar a avut lungimea variabilă datorită întinderii frecvente a brațului satelifer scurt, și a fost mai mic decât cromozomul 3 și mai mare decât cromozomul 4. Cromozomii 1, 2, 3 și 5 sunt metacentrici, iar cromozomul 4 este acrocentric. De exemplu, în figura 4 sunt prezentate tipurile de cromozomi, caracterizați astfel: cromozomul 1: cel mai mare cromozom al complementului, cu o bandă distinctă la centromer și cu bandare terminală slabă și variabilă; lungimea relativă (complement haploid

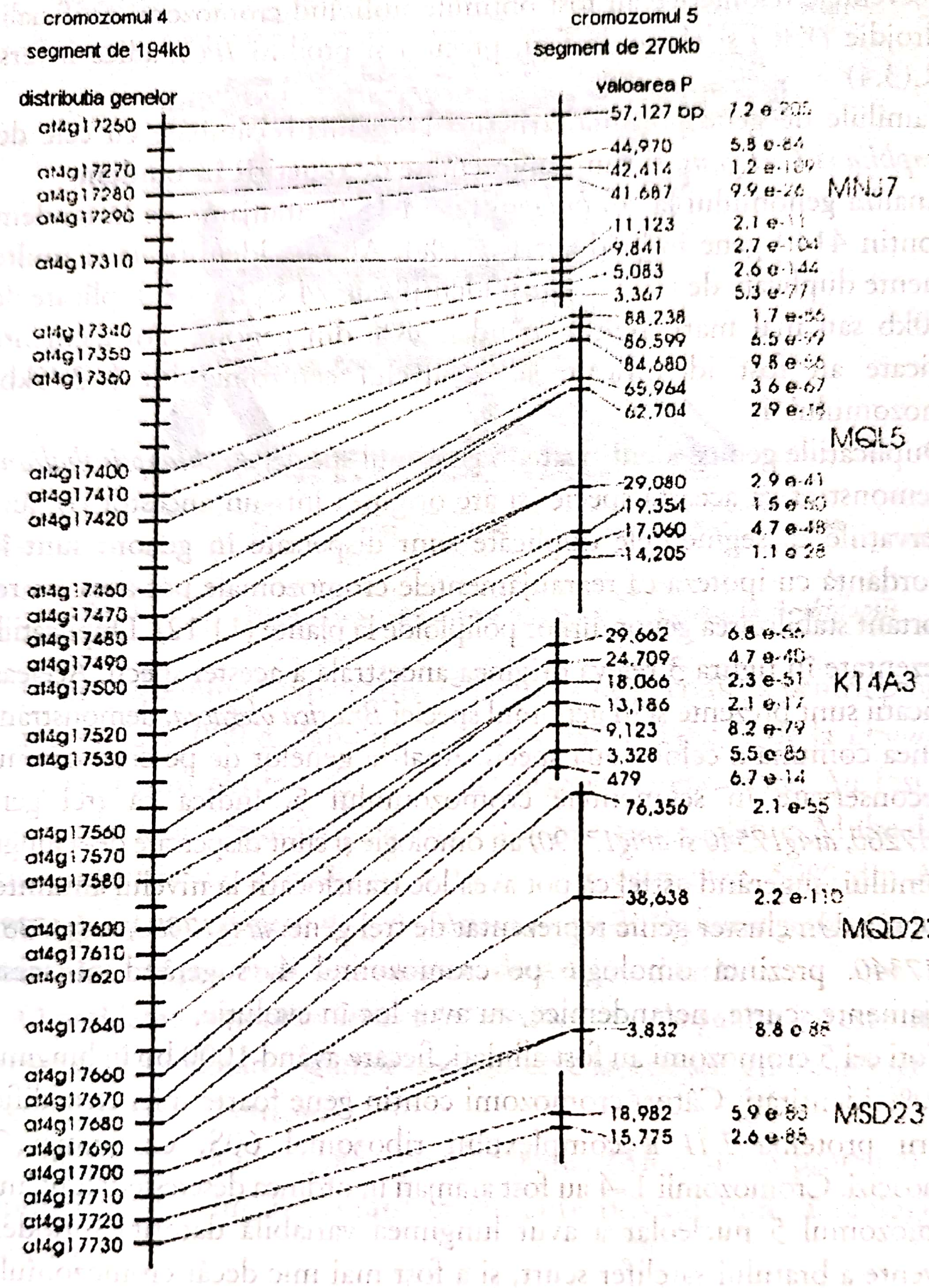

cromozomul 4
segment de 194kb
distributia genelor
at4g17250
at4g17270
at4g17280
at4g17290
at4g17310
at4g17340
at4g17350
at4g17360
at4g17400
at4g17410
at4g17420
at4g17460
at4g17470
at4g17480
at4g17490
at4g17500
at4g17520
at4g17530
at4g17560
at4g17570
at4g17580
at4g17600
at4g17610
at4g17620
at4g17640
at4g17660
at4g17670
at4g17680
at4g17690
at4g17700
at4g17710
at4g17720
at4g17730
cromozomul 5
segment de 270kb
valoarea P
57,127 bp 7.2 e-205
44,970 5.8 e-84
42,414 1.2 e-109
41,687 9.9 e-26
MNJ7
11,123 2.1 e-11
9,841 2.7 e-104
5,083 2.6 e-144
3,367 5.3 e-77
88,238 1.7 e-56
86,599 6.5 e-97
84,680 9.8 e-56
65,964 3.6 e-67
62,704 2.9 e-18
MQL5
29,080 2.9 e-41
19,354 1.5 e-50
17,060 4.7 e-48
14,205 1.1 e-28
29,662 6.8 e-56
24,709 4.7 e-40
18,066 2.3 e-51
K14A3
13,186 2.1 e-17
9,123 8.2 e-79
3,328 5.5 e-85
479 6.7 e-14
76,356 2.1 e-55
38,638 2.2 e-110
MQD22
3,832 8.8 e-85
18,982 5.9 e-53
MSD23
15,775 2.6 e-85

Fig. 3 — Segmentele duplicate de la nivelul cromozomilor 2 și 5 la *Arabidopsis thaliana*. Secvențele nucleotidice reprezentând toate modelele genelor de pe cromozomul 4 între *at4g15970* și *at4g17810* care au fost obținute utilizând analiza *BLASTIN* de pe serverul *MIPS* care servește ca bază de date pentru secvențele nucleotidice din ADN genomic de la *Arabidopsis*.

= 100% = 25.4%; raportul brațelor (brațul lung/lungimea totală a cromozomului) = 22.2%, raportul brațelor = 0.58. Cromozomul 3: bandă centromerică, lungimea relativă 19.6%, raportul brațelor = 0.58. Cromozomul 4: cel mai mic cromozom al complementului, cu bandă centromerică, brațul lung bandat variabil terminal, lungimea relativă = 19.2%, raportul brațelor = 0.73. Cromozomul 5: bandă centromerică distinctă și satelit bandat pe brațul scurt, lungimea relativă = 19.4%, raportul brațelor = 0.52.

Au fost studiate numeroase linii de *Arabidopsis* și s-a constatat că există diferențe minore între modelele de bandare ale acesora (figura 5); în cariotipurile *T-20* au fost depistate o formă heteromorfă și respectiv ambele forme homomorfe în ceea ce privește incidența bandei terminale în

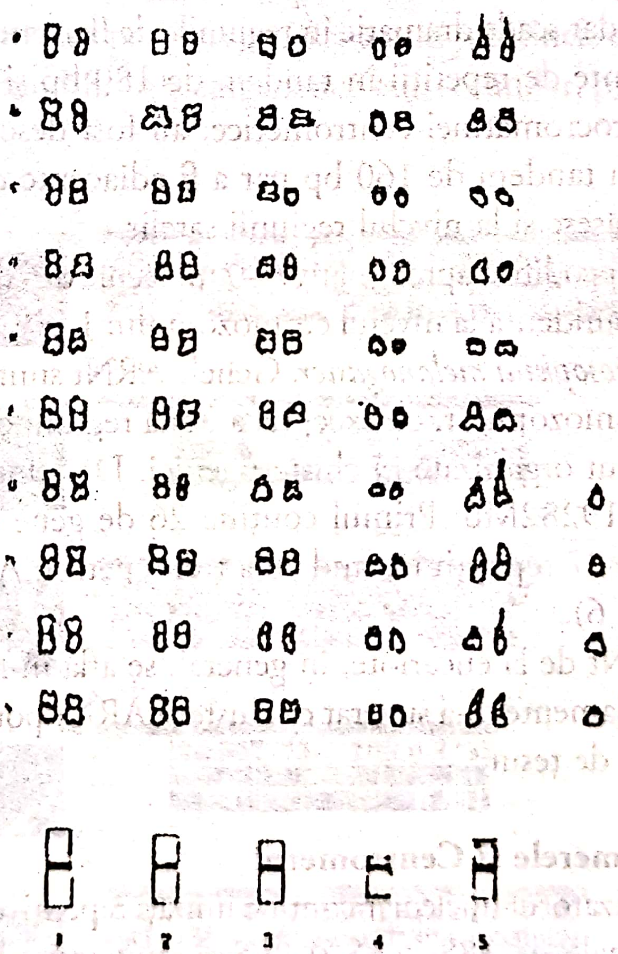


Fig. 4 — Cariotipurile bandate „C" (descendenții T-20). a-f. Complementul normal diploid. g-k: Trisomici primari de *Arabidopsis thaliana*. Cromozomul supranumerar este un cromozom 4. jos: Cariograma de *Arabidopsis thaliana* bandată „C", bazată pe cariotipurile a-k.

cromozomul 4. Prin colorația G, cromozomul 4 din *Col-O* a prezentat frecvent o bandă terminală în brațul lung, iar pentru cromozomul 5, satelitul a fost mai mare decât pentru *T-20*. Grosimea benzii centromerice pentru cromozomii 1 și 2 variază, de asemenea. În toate liniile analizate, au fost observați nuclei endopoliploizi (conținutul aproximativ de ADN: 8C sau 16C) în țesuturile diferențiate ale radăcinii, însă pot exista și diferențe, endopoliploidia fiind mult mai frecventă în *Col-O* comparativ cu alte linii testate (Ambros & Schweizer, 1976).

Mai puțin de 15300 gene (60%) sunt exprimate, fiind indicate de prezența EST-urilor, și codifică pentru proteine ale mașinăriei fotosintetice, sintezei proteinice și câteva enzime metabolice, cum ar fi catalazele. Distribuția EST este mai mare sau mai mică, în funcție de lungimea cromozomilor, dar scade dramatic în regiunile de flancare ale cromozomilor.

Două secvențe de repetiții în tandem de 180 bp și 500 bp, localizate la nivelul heterocromatinei centromerice, au fost descrise la *Arabidopsis.* Alte repetiții în tandem de 160 bp par a fi adiacente centromerului, dar acestea nu se găsesc și la nivelul regiunii satelit.

Cromozomii codifică aproximativ 600 molecule de ARNt, molecule care se găsesc din abundență la nivelul cromozomului 1, și au structură similară cu cele de la *Drosophila melanogaster.* Genele ARNt sunt distribuite regulat de-a lungul cromozomilor, cu excepția a două regiuni din cromozomul 1, unde genele sunt organizate în clusteri genici. Doi clusteri sunt localizați la 9089Mb și 19282Mb. Primul conține 26 de gene ce codifică pentru ARNt^{Pro} și alte 27 repetiții în tandem a trei repetiții: ARNt^{Tyr}- ARNt^{Tyr}-ARNt^{Ser}(figura 6).

Genele ARNt de la eucariote, în general, se află în familii multigenice cu diverse aranjamente. S-a sugerat că clusterii ARNt pot reflecta coreglarea cu specificitate de țesut.

ARN, Telomerele și Centromerul

NOR-organizatorul nucleolar conține unități repetitive ce codifică pentru genele ribozomale de 18S, 5,8S și 25S și sunt transcrise de către ARN polimeraza I. Acestea împreună cu ARN 5S sunt transcrise de către ARN polimeraza III.

La *Arabidopsis*, regiunile NOR sunt juxtapuse cu telomerele cromozomului 2 și 4, și sunt întrerupte de unitățile de 18S, 5,8S și 25S care sunt orientate pe cromozom atât dinspre centromer spre telomer cât și vice-versa.(7)

La nivelul cromozomilor 3, 4 și 5, genele ce codifică pentru 5S sunt localizate în centromerul acestora. NOR = 3,5–4,0 megaperechi de baze și prezintă 350 - 400 unități ARN metilate de ~ 10 kb.(9)

Telomerele sunt compuse din repetiții *CCCTAA* și au ~ 2–3 kb. Telomerele sunt separate prin secvențe repetitive de 4 kb ce reprezintă unitățile subtelomerice.

Centromerul conține numeroase elemente repetitive, inclusiv retroelemente, transpozoni, microsateliți și secvențe ADN mijlociu repetate. Aceste repetiții sunt rare în regiunea de eucromatină și din abundență în regiunea pericentromerică. Aceste repetiții sunt metilate.(10)

Funcția centromerilor poate fi specificată prin proteinele care leagă centromerul, dar și prin modificările epigenetice sau, secundar, prin structura lor.

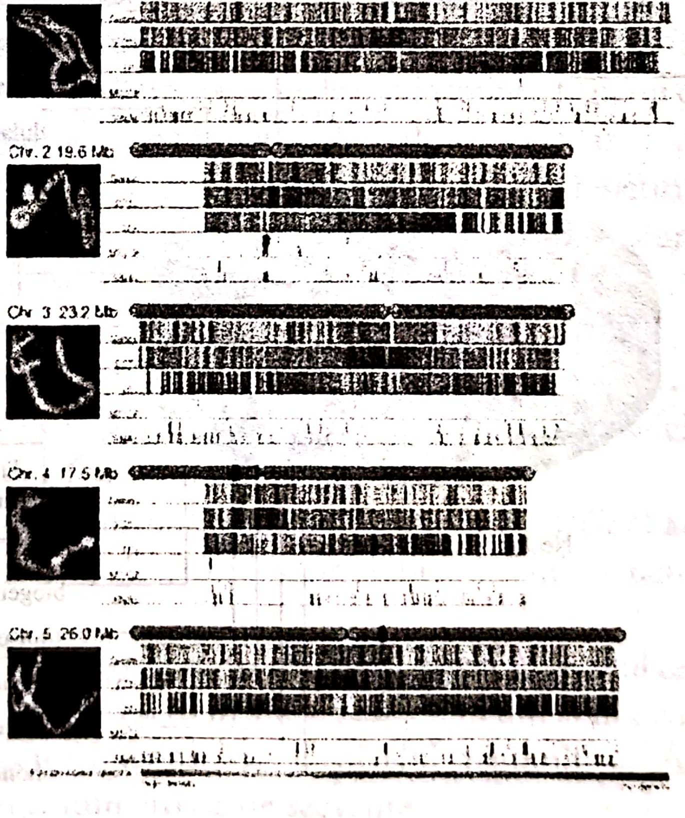


Fig. 6 — Reprezentarea cromozomilor la *Arabidopsis*

La *Arabidopsis* au fost identificate 2 clase de secvențe: *SNP* – polimorfisme de nucleotide unice; InDels –inserții-deleții.

În total, au fost detectate 25274 *SNP*-uri, adică ~ 1*SNP* per. 3.3kb. Tranziția și transversia sunt reprezentate procentual astfel: (A/T – G/C) ~ 52.1% în SNP, 17.3%, între A/T – T/A, 22.7%, între A/T – C/C și 7.9%, între C/G – G/C.(5)

În total au fost detectate 14570 *InDels*, la un spațiu de 6.1 kb.

Structura genelor este afectată de puține InDeluri și SNP-uri. Poziția acestora a fost cartată, descoperindu-se astfel ~ 87427 exoni și 70379 introni.(8)

Au fost detectate polimorfisme în ~ 7% din exoni precum și secvențe alterate de spațiere, în 25% din gene.

S-a demonstrat faptul că 69% dintre gene au funcție similară cu cele de la alte organisme, o mare parte dintre gene fiind implicate în procesele de transcripție, în metabolism, în sinteza ADN, în comunicări celulare, în

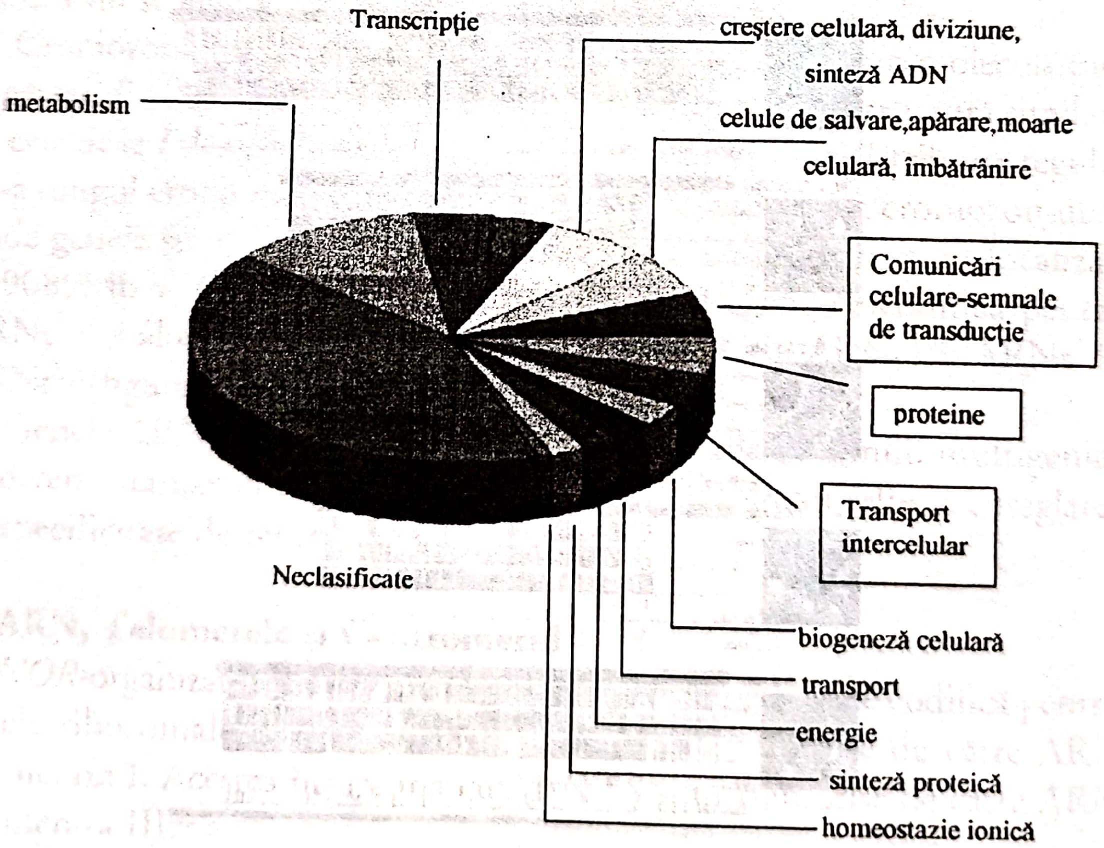


Fig.7. — Categorii de gene descrise la *Arabidopsis*

transport intercelular. Datele vizează sinteza de proteine de homeostazie ionică, dar o mare parte dintre gene sunt încă neclasificate (figura 7).

Analizele biochimice au demonstrat că, spre deosebire de numeroase familii de proteine întâlnite la toate eucariotele, plantele conțin mai mult de 150 de familii de proteine unice. Aceste familii includ factori transcripționali, proteine structurale, enzime și proteine cu funcție necunoscută. Membrii acestor familii de gene comune la toate eucariotele se găsesc într-un număr relativ mare sau mic în genomul lui *Arabidopsis.*

Elementele transpozabile

Transpozonii, inițial identificați de către Barbara McClintock, la porumb, au fost identificați apoi la toate organismele procariote și eucariote.

Se cunosc două clase de elemente transpozabile și anume Clasa I - elemente care sunt replicate direct în ARN intermediar și Clasa II - elemente care sunt replicate în ADN.

La *Arabidopsis,* transpozonii reprezintă 10% din genom. Genomul la *Arabidopsis* numară 2.109 elemente din Clasa I, 2.209 elemente din Clasa II și 1.209 noi grupuri de elemente transpozabile. Există o relație inversă între densitatea genelor și retroelementele din marginea regiunii centromerice.

Elementele transpozabile întâlnite la *Arabidopsis*, dar și la alte plante, includ elementele *copia* și *gypsy*, *LTR* - elemente lungi repetitive, situate în retroelemente, elemente lungi de spațiere - *LINE*, elemente scurte de spațiere - *SINE*, elementele *hobo*/ *Activator*/*Tam 3,* elementele *CACTA*, precum și elemente în miniatură, invers repetate - *MITE.*(6)

Pe de altă parte, deși genomul este relativ mic, au fost identificate și elementele *Tourist* ce conțin *ORF*-uri, adică cadre deschise citirii, care au similitudine cu transpozaza de la bacterii.

Elementele *Basho* și *Mutator*, numite și elemente *MULE*, au fost pentru prima dată secvențiate la *Arabidopsis*, reprezentând structuri unice de transpozoni.(7)

Clasa I de elemente, retroelementele, sunt situate la nivelul centromerului, iar elementele din Clasa II și elementele *Basho* sunt din abundență la periferia domeniilor pericentromerice. Și la nivelul regiunii satelitice au fost identificate repetiții numeroase de secvențe.

Regiunile bogate în transpozoni sunt considerate a fi gene sărace și au o rată scăzută a recombinării și a perechilor *EST*, indicând corelația între scăderea expresiei genice, densitate mare de transpozoni și recombinare scăzută.

Rolul elementelor transpozabile în genom, în structura și organizarea cromozomilor la *Arabidopsis* nu poate fi considerat ca fiind un model pentru toate organismele, deoarece metilarea ADN și alte forme de modificare a cromatinei induc reglarea și modificarea transpoziției.

Cele trei genomuri de la plante și anume cel nuclear, cel cloroplastic și cel mitocondrial diferă în ceea ce privește numărul genelor, organizarea lor și stabilitatea. Genomul plastidial este compact împachetat și cuprinde regiuni conservate de secvențe la toate plantele, în timp ce genele mitocondriale sunt dispersate și sunt subiectul unor numeroase procese de recombinare.

Genomurile organelare sunt rămășițele unor organisme independente: plastidele sunt derivate de la cianobacterii și mitocondriile de la α-proteobacterii. Genele plastidiale includ toate subunitățile care codifică pentru sistemul fotosintetic și căile de transport a electronilor, în timp ce genele mitocondriale codifică pentru subunități esențiale ale căii respiratorii. Organitele conțin seturi specifice de proteine membranare care, împreună cu proteinele de întreținere, numără pentru 61% de gene în cloroplaste și 88% în mitocondrii. (tabel.)

Tabel Trăsături generale ale genelor ce codifică pentru cele trei genomuri la Arabidopsis

	Nucleu/citoplasmă	Plastide	Mitocondrii
Mărime genom	125Mb	154kb	367kb
Genom echivalent/celulă	2	560	26
Duplicații	60%	17%	10%
Nr.gene proteice	25.498	79	58
Ordinea genelor	variabilă	conservată	variabilă
Densitate (kb/gene proteice)	4,5	1.2	6.25
Gene cu introni	79%	18,4%	12%
Gene /pseudogene	1/0.03	1/0	1/0.2-0.5
Transpozoni (% din mărimea genomului)	14%	0%	4%

Au fost realizate studii numeroase în ceea ce privește structura genomului la plante, la membrii familiei *Brassicaceae*, și anume la specii ale genului *Brassica*, datorită avantajului pe care îl prezintă din punct de vedere economic. Astfel, studii comparative între *Brassica* și *Arabidopsis*, s-au realizat în scopul stabilirii relațiilor filogenetice între specii. Au fost analizate 6 specii de *Brassica*, trei dintre acestea sunt considerate specii diploide care diferă în ceea ce privește numărul de cromozomi. *B.nigra*, *B.oleracea*, *B.rapa* au 2n=16, 18 și 22 de cromozomi. Împerecherea prin combinarea speciilor diploide *B.rapa (AA)*, *B.nigra (BB)* și *B.oleracea (CC)* a avut ca rezultat obținerea de specii amfiploide: *B.juncea (AABB)*, *B.napus (AACC)*, *B.carinata (BBCC)*.

Mărimea genomului la speciile haploide este foarte mare, în comparație cu speciile parentale, și a fost estimată la 1105–1235 Mpb la *B.napus* și *B.juncea*.

Studiile de cartare genică la aceste specii de plante au demonstrat că genomurile sunt duplicate. S-a demonstrat că genomul *B.nigra* poate fi identificat în *B.oleracea* și *B.rapa*.

Făcându-se comparație în ceea ce privește segmentele de gene de la specii ale genului *Brassica*, s-a demonstrat că există secvențe conservate în exoni. Pentru 13 gene diferite de la *Arabidopsis*, s-a găsit omologie de 87% la *B.napus*, în ceea ce privește nucleotidele și nivelul de aminoacizi. Valori similare s-au obținut și prin compararea secvențelor proteinice ce codifică pentru alte 6 gene.

Genele de la *Brassica* codifică pentru o proteină ipotetică, omoloagă cu genele de rezistență la boli, cum ar fi, *RPM1* și *RPS2*. S-a demonstrat că secvența de aminoacizi a acesteia prezintă identitate de 81–86%, atunci când s-a făcut comparație cu genele omoloage de la *Arabidopsis*.

Completarea genomului la *Arabidopsis* reprezintă o piatră de hotar pentru biologie, în general, și pentru știința plantelor, în particular. Pe de altă parte, cunoașterea secvențelor de gene, a informației genetice, este necesară deoarece contribuie la avantajele acestei științe.

Secvențierea genomului la *Arabidopsis* reprezintă punctul de plecare pentru secvențierea și a altor genomuri de plante. De exemplu, proiectul „Identificarea moleculara de noi gene la plante", inițiat de Centrul de Biotehnologie pentru Inovație, Dezvoltare și Creștere în Europa (*BRIDGE*), a avut drept scop izolarea a numeroase gene care mediază efectele mediului asupra înfloririi. Utilizarea drept „țintă" a transpozonilor *Ac* și *En* a permis generarea a mii de familii genice conținând mutante potențiale. Cartarea genică a permis localizarea genelor din 16 megabaze (Mb) de pe cromozomul IV, precum și dintr-o regiune a cromozomului V.

Construirea unei bănci de ADN de *Arabidopsis* într-un vector reprezentat de un cromozom bacterian artificial care, ca și băncile *P1* și *YAC*, conține fragmente mari de ADN genomic, dar care facilitează folosirea coloniilor de *E. coli* pentru screening și amplificare, este o altă direcție de cercetare actuală. S-au înregistrat progrese remarcabile în clonarea genelor cunoscute prin fenotipurile lor mutante, identificarea de mutații noi și semnificative, precum și în înțelegerea funcțiilor și interacțiunilor genice. Un alt obiectiv major al cercetărilor actuale îl reprezintă identificarea funcției unei gene cunoscând secvența sa. Cunoscând secvența și funcția, va fi posibilă modificarea funcției plantei în direcții noi și folositoare.

Studiul genomului la *Arabidopsis* reprezintă o sursă permanentă de informații referitoare la creșterea și dezvoltarea plantelor, precum și la atacul bacterian. Au fost secvențiate un număr mare de transcripte genice și s-au îmbunătățit hărțile genetice și fizice ale cromozomilor. Cercetările cele mai recente includ: identificarea și clonarea genelor necesare dezvoltării rădăcinilor și florilor; clonarea receptorilor pentru lumina roșie și albastră; identificarea și clonarea genelor implicate în răspunsul la hormonii plantelor: etilenă și acid abscisic, ca și a celor pentru răspunsul la atacul bacterian; harta genetică ce cuprinde 400 markeri; identificarea a peste 11.500 secvențe țintă exprimate (*EST*-uri); harta fizică a cromozomului IV.

Plantele superioare au evoluat simultan, fapt ce permite utilizarea informației secvenței genice de *Arabidopsis* pentru identificarea genelor omoloage la alte plante, incluzând speciile importante pentru agricultură, care au genomuri mult mai mari, redundanță genică mai mare și un procent mult mai ridicat de secvențe repetitive. Genele de la *Arabidopsis* sunt mult mai ușor de clonat decât corespondentele lor de la plantele cu genomuri mai mari și de aceea au fost deja folosite pentru identificarea și manipularea genelor speciilor importante pentru agricultură.

De exemplu, cercetările de la Dupont (Franța) s-au bazat pe utilizarea genelor de la *Arabidopsis* drept probe pentru clonarea genelor desaturazelor acizilor grași de la varietăți de specii uleioase. Genele clonate au fost modificate și reintroduse în speciile inițiale în scopul modificării compoziției uleiului, pentru o alimentație sănătoasă. Ulterior, aceste gene au fost folosite în scopul identificării genelor corespunzătoare de la soia și de la alte plante de cultură, ca și în ingineria genetică, pentru obținerea plantelor cu concentrații scăzute de polinesaturaze. În acest fel, va fi posibilă eliminarea hidrogenării catalitice și transformarea compoziției în uleiuri a unor anumite culturi de așa manieră încât să corespundă mai bine necesităților de hrană ale omenirii.

Numeroase gene ale bacteriei *Alcaligenes eutrophus* au fost introduse în *Arabidopsis*, astfel încât produșii genici s-au acumulat în citoplasmă. Aceasta a avut drept rezultat acumularea unor cantități mici de polihidroxibutirat (*PHB*). Mai recent, cantitatea de PHB acumulată de către plantele de *Arabidopsis* a fost crescuta de peste 100 de ori în urma transferului a trei gene din *Arabidopsis eutrophus* în plantele transgenice de *Arabidopsis*, astfel încât produșii genici s-au acumulat în plastide.

CAPITOLUL XXXIX

UNELE CARACTERISTICI MOLECULARE ALE COMPONENTELOR GENOMICE DE LA TOMATE ȘI PORUMB

1. INTRODUCERE

Dezvoltarea și diferențierea organelor de reproducere reprezintă un complex de procese ce se manifestă printr-o serie de schimbări citologice și biochimice, care, la rândul lor, se află sub controlul unui sistem de numeroase de gene specifice ce dispun de o expresie diferențiată. Astfel de procese, ca inițierea organelor de reproducere, meioza, gametogeneza etc ocupă un loc important în ciclul vital al organismelor eucariote, de aceea în decursul unei perioade îndelungate de timp ele s-au găsit în centrul atenției multor savanți din diferite domenii ale biologiei. Prin cercetările citologice, biochimice și genetice, s-a acumulat un volum enorm de informații științifice care au îmbogățit cunoștințele noastre despre cele mai importante evenimente ce au loc pe parcursul dezvoltării sistemului de reproducere. Drept rezultat, s-au descoperit conjugarea cromozomilor omologi (*sinapsa cromozomală*), organizarea ultrastructurală a *complexului sinaptonemal*, cât și rolul lui în realizarea *crossing-overului*. În același timp, a fost studiată sinteza ADN, atât la stadiul premeiotic, cât și la unele stadii ale Profazei I a meiozei, ceea ce a permis descoperirea unor succesiuni de nucleotide specifice pentru stadiile de *zigoten* și *pachiten* (**zADN** și **pADN**). Totodată, s-au obținut informații referitoare la organizarea și maturizarea gametofitului mascul și femel, la diferite specii de plante. Ulterior, a apărut un interes pentru cercetările genetice ale determinării sexului la plantele dioice.

Odată cu dezvoltarea accelerată a biologiei moleculare, a sporit brusc interesul pentru cercetările moleculare realizate asupra sistemului de reproducere. Ca rezultat, pe parcursul ultimilor 10 ani, au fost obținute informații prețioase ce reflectă aspectele moleculare ale procesului de reproducere. Au fost identificate gene-cheie ce intervin în reglarea celor mai importante evenimente ale meiozei și gametogenezei, precum și în sporulare. Asemenea cercetări au fost efectuate cu precădere la eucariotele inferioare, așa cum sunt drojdiile, din care cauza, astfel de informații științifice cu privire la plantele superioare sunt destul de puține. Nu sunt cunoscute genele implicate în controlul genetic al proceselor de bază care se desfășoară pe parcursul dezvoltării sistemului de reproducere. Sunt slab cercetate și genele implicate în determinarea sexului la plante. Acumularea acestor date noi va contribui la înțelegerea mai profundă a bazei moleculare a sistemului de reproducere la plante. De aceea, studiul molecular al genelor de activitatea cărora depinde desfășurarea corectă a diferențierii, dezvoltării și maturizării organelor de reproducere la plante prezintă o problemă fundamentală actuală, care se află în atenția multor cercetători din domenii conexe.

Procesele de diferențiere, dezvoltare și maturizare ale organelor de reproducere la plante se află sub controlul strict al unor gene, deocamdată prea puțin studiate. Cercetările moleculare ale unor astfel de gene prezintă un interes deosebit, deoarece permit înțelegerea mai profundă a mecanismelor de inițiere și desfășurare a proceselor din organele de reproducere la plante. Mai mult decât atât, cercetările respective deschid pe viitor probleme concrete noi referitoare la studiul organizării moleculare a genelor, ce se exprimă diferențiat în procesul de reglare a funcționării aparatului reproductiv.

Cercetările cu privire la evenimentele moleculare ce se desfașoară în organele de reproducere s-au declanșat la începutul anilor 1980, când un grup de savanți a efectuat caracterizarea moleculară a unor transcripte specifice în microsporocite, la genul *Lilium* (Hotta și colab., 1985). Ceva mai târziu, pentru unele transcripte specifice din Profaza I, s-au depistat domenii conservate cu unele gene de șoc termic. În același timp, a fost demonstrată expresia acestor gene în diferite etape de dezvoltare ale microsporocitelor, cât și organizarea lor moleculară (Bouchard, 1990). Paralel, s-au depistat unele gene ce controlează formarea țesutului tapetal în gametofitul mascul (McCormick, 1993). Însă, deocamdată, informațiile științifice cunoscute nu permit înțelegerea deplină a controlului genetic al evenimentelor de importanță majoră, deasfășurate pe parcursul dezvoltării organelor de reproducere. Odată cu elaborarea unor strategii experimentale originale a apărut posibilitatea obținerii datelor noi cu privire la genele ce controlează formarea strictă a organelor de reproducere la plante.

În etapa actuală, cercetările genetico-moleculare ale sistemului de reproducere la plante se efectuează pe scară largă, în diferite țări ale lumii. Interesul sporit pentru asemenea investigații poate fi explicat prin faptul că sistemul reproductiv este un model excelent pentru examinarea mecanismelor de reglare a expresiei genelor ce controlează cele mai importante evenimente din ciclul vital al sporofitului și gametofitului. Acumularea informațiilor referitor la structura primară a genelor sistemului reproductiv și analiza lor comparativă în Banca mondială de nucleotide deschid noi perspective în studiul problemelor evoluționiste. Totodată, astfel de cercetări furnizează informații noi care aprofundează cunoștințele despre organizarea moleculară și activitatea funcțională a genomului la plante. În tabelul de mai jos se redă nivelul și durata de expresie a clonelor de cADN obținute ca rezultat al **screening**-ului diferențiat la tomate și porumb.

Tabelul 1

Nivelul și durata de expresie a clonelor de cADN obținute în rezultatul screening-ul diferențiat la tomate și porumb

Clona analizată	Meioză	Microspori	Polen tânăr	Polen matur	Frunze	Rădăcini	Organe femele
ctg3		+	++	+++			
ctg5		++	+++	+++			
ctg12		+++	+++	+++	+	+++	+++
ctg13	+	+	+++	+++			
ctg15		++	+++	+++			
cmg1	+	+	+	++			++
cmg2	+	+	++				
cmg3			+++	+++			
cmg4			+				
cmg5			+++				++
cmg7	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++
cmg8			+	+++			
cmg9	+	++	++	+++			++
cmg11			+	++		+++	

+ — nivel scăzut al expresiei; ++ — nivel mediu al expresiei; +++ — nivel înalt al expresiei

Inițierea cercetărilor moleculare nu este posibilă fără a avea un material biologic omogen din punct de vedere ontogenetic și funcțional. În acest scop, s-a efectuat analiza citologică a anterelor, la diferite stadii de dezvoltare de la tomate și porumb. S-a demonstrat o corelație strictă între dimensiunile anterelor și stadiile lor de dezvoltare (Barbacaru, 2000).

Tabelul 2

Clasificarea clonelor de cADN la tomate și porumb după screening-ul substractiv conform criteriilor de specificitate și nivelului de expresie

Denumirea clonei de cADN	Specificitatea clonei de cADN la stadiile Profazei I ale meiozei				Nivelul și durata de expresie			
Frunze	L+Z	P+D	Di+Pm	Frunze	L+Z	P+D	Di+Pm	
tcs2		x	x	x		+++	+++	+++
tcs4		x	x	x		+++	+++	+++
tcs6		x	x	x		+++	+++	+++
tcs7		x	x	x		+++	+++	+++
tcs8	x	x	x	x	+++	+++	+++	+++
tcs1		x	x	x		+++	++	+
tcs3		x	x	x		+++	++	+
tcs5	x	x	x	x	+	+++	++	+
tcs9	x	x	x	x	+	+++	++	+
tcs10		x	x	x		+++	++	+
tcs11		x	x	x		++	+	+
tcs13		x	x	x		+++	+	+
tcs14		x	x	x		++	+	+
tcs15		x	x			+++	+	
tcs17		x	x	x		+++	+	+
tcs18		x	x	x		+++	+	+
tcs19		x	x	x		+++	++	+
tcs20		x				++		
tcs21		x				++		
tcs22		x				++		
tcs25		x				+		
tcs26		x				++		
tcs30		x	x			++	+	

Denumirea clonei de cADN	Specificitatea clonei de cADN la stadiile Profazei I ale meiozei				Nivelul și durata de expresie			
Frunze	L+Z	P+D	Di+Pm	Frunze	L+Z	P+D	Di+Pm	
tcs32		x				++		
tcs35		x				++		
zms2		x	x	x		+++	+++	+++
zms4		x	x	x		++	+++	+++
zms6	x	x	x	x	+	+++	+++	+++
zms8		x	x			++	+	
zms10		x	x			+	++	
zms11		x	x			++	+	
zms12		x	x			++	+	
zms13		x	x			++	+	
zms14		x	x			++	+	
zms1		x				+		
zms5		x				++		
zms15		x				+		

X	prezența expresiei	F	Frunze
+++	nivel înalt de expresie	L+Z	Stadiile de leptoten și zigoten
++	nivel mediu de expresie	P+D	Stadiile de pachiten și diploten
+	nivel mic de expresie	Di+Pm	Stadiile de diachineză și postmeioză

În cercetările moleculare efectuate de noi, am demonstrat acumularea diferențiată a transcriptelor pe parcursul dezvoltării organelor de reproducere la tomate și porumb. Informații variate au fost obținute ca rezultat al clonării transcriptelor și analizelor diferențiate și substractive a bibliotecilor de cADN. Analiza Northern-blot a condus la determinarea specificității clonelor obținute. Clonele obținute de noi au fost numite după cum urmează: ***ctg*** **– cDNA-tomato gametophyte;** ***cmg*****–cDNA maize gametophyte;** ***tcs*****–tomato cDNA substraction;** ***zms–Zea mays*** **substraction**. Pe baza acestor rezultate, transcriptele studiate au fost clasificate conform criteriilor de abundență și specificitate (tabelele 1 și 2).

O parte destul de importantă și informativă în cercetările moleculare ale genelor specifice ce activează în diferite țesuturi este identificarea structurii primare. Astfel de cercetări prezintă o preocupare pentru savanții ce activează în diferite domenii ale biologiei, precum și în medicină, și agricultură. Cercetările noastre au demonstrat că 40% dintre clonele analizate prezintă gene noi. În circa 10–15% dintre clonele analizate s-au identificat domenii conservate, prezente și în componența genelor de o importanță majoră în dezvoltarea organelor de reproducere la alte organisme (Barbacaru, 2000). În componența altor clone s-au identificat omologii semnificative cu gene cunoscute la alte organisme și care îndeplinesc funcții atât în organele generative, cât și în cele vegetative. Pentru noi au prezentat un interes deosebit clonele de cADN ***tcs35*** (care are o omologie cu gena ***RAD16,*** de la drojdii) și ***zms1*** (omologie cu ***RAD56,*** de la drojdii). Clona ***tcs35*** a fost remarcată prin faptul că în componența ei au fost identificate patru domenii ce au omologie destul de semnificativă la nivel de proteină, cu proteina codificata de gena ***RAD16***. Aceste rezultate sunt prezentate în figura1.

În ce privește clona ***zms1*** a fost identificat doar un singur domeniu conservat cu gena ***RAD56,*** la nivel de secvență de ADN.

Analiza Northern-blot a demonstrat o specificitate de expresie înaltă pentru stadiile Profazei I a meiozei. Rezultatele acestor experiențe sunt prezentate în figura 2.

Un rezultat informativ este și analiza Southern a clonelor analizate care au specificitate diferită. Pentru clonele înalt specifice s-a demonstrat că genele lor se află în genom într-o singură copie, pe când cele cu o specificitate joasă, se află în mai multe copii. Totodată, clonele ce dispun de omologii înalte cu gene cunoscute de la alte organisme s-au dovedit a fi prezente și în genomul altor specii de plante (Tabelul 3).

Proteina *tcs35*	394	NISLAETAEPPSDLILPLLRYQKEWLAGQ*SKKNLHARGV	513
Proteina comparată	394	NAVIAETAEPPSDLIMPLLRYQKEFLAWATKQEQSVAGGI	513
Proteina *tcs35*	486	QEESACKGGILADEMGMGKTLQAIALGL	569
Proteina comparată	152	KQEQSVAGGILADEMGMGKTIQAISLVL	179
Proteina *tcs35*	333	ETVEEEMDEVILKD	374
Proteina comparată	49	EEEEEELEEVVAND	62
Proteina *tcs35*	321	VLKWETVEEEMDEVI	365
Proteina comparată	94	VLLWETWEKEQNSWI	365

Fig. 1 — Analiza computerizată a secvenței de aminoacizi a proteinei *tcs35* și a proteinei *Rad16*, de la drojdii (*S. cereviziae*)

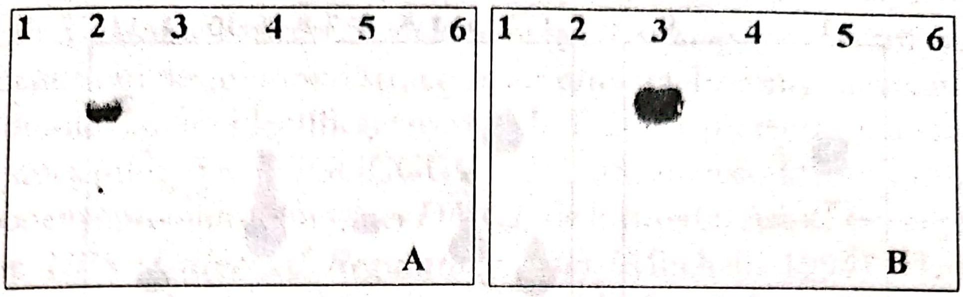


Fig. 2 — Analiza Northern a clonelor de cADN *tcs35* (A) și *zms1* (B). Pentru analiză s-au utilizat câte 10μg de ARN total izolat din:
1 – organe vegetative; 2 – antere la stadiul de leptoten; 3 – antere la stadiul de zigoten; 4 – antere la stadiul de pachiten; 5 – antere la stadiul de diploten; 6 – polen

Tabelul 3

Identificarea numărului de copii ale clonelor de cADN în genomul de tomate și porumb. Prezența unor clone de cADN și în genomul altor specii (conform analizei Southern)

Clonele de cADN	Numărul de copii	Prezența clonelor de cADN în genomul altor specii		
		Clonele de cADN	Specia	Denumirea latină a speciei
ctg5, cts15, cmg3	5–8	*ctg5, cmg3*	Arabidopsis Ovăz Grâu dur Varză	*Arabidopsis thaliana* *Avena sativa* *Triticum durum* *Brassica oleracea*
ctg3, ctg13, ctg15, tcs2, tcs4, tcs7, tcs8, tcs1, tcs3, tcs10, tcs13, tcs17, tcs18, tcs19, cmg2, cmg4, cmg5, cmg7, cmg8, cmg9, cmg11, zms2, zms4, zms6, zms8, zms10, zms11	3–5	*ctg3, ctg15, tcs15, zms6, zms11*	Arabidopsis Soia Fasole Floarea-soarelui	*Arabidopsis thaliana* *Glycine hispida* *Phaseolus vulgaris* *Helianthus annus*
		cmg4, cmg11, tcs32	Floarea-soarelui	*Helianthus annus*
tcs20, tcs21, tcs22, tcs25, tcs26, tcs32, tcs35, zms13, zms14, zms1, zms5, zms15	1–2	*tcs3, zms15*	*Arabidopsis*	*Arabidopsis thaliana*

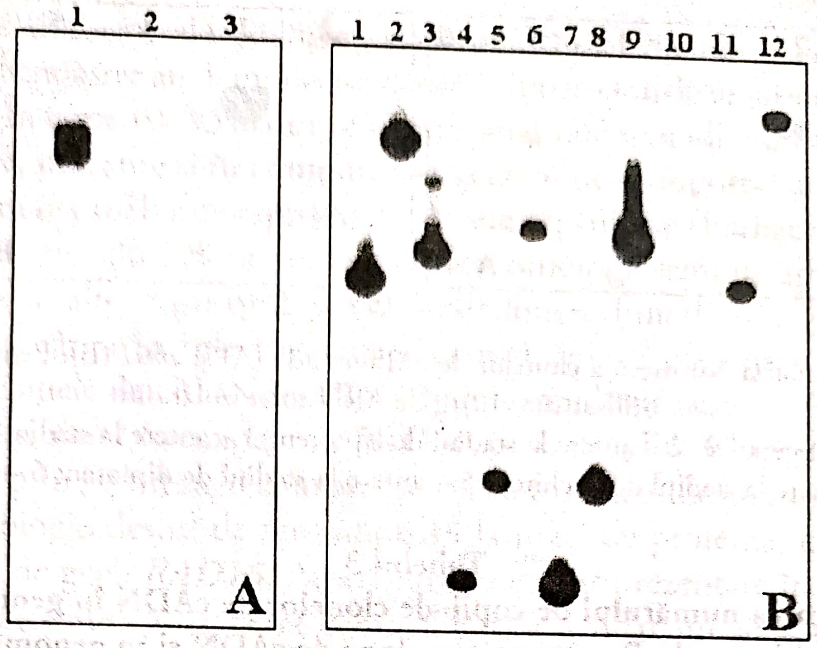


Fig. 3 — Rezultatul analizei Southern-blot a clonelor genomice, utilizând în calitate de sonde pentru hibridare clonele cADN *tcs35* (A) și *zms1* (B)

În experiențele ulterioare, interesul nostru a fost legat de clonarea genelor reprezentate de clonele cADN ***tcs35*** și ***zms1***. Pentru aceasta, s-a efectuat **screening**-ul bibliotecilor genomice de tomate și porumb. Ca rezultat al acestor experiențe au fost obținute trei clone pentru ***tcs35*** și 12 clone genomice – pentru ***zms1***. Analiza restricțională și analiza electroforetică ale clonelor genomice obținute au demonstrat că ele sunt clone diferite. Pentru a identifica fragmentele de ADN omoloage cu clonele de cADN ***tcs35*** și ***zms1*** am efectuat analiza Southern-blot. Rezultatele acestor experiențe sunt prezentate în figura 3.

După cum se vede, în cazul hibridării cu clona de cADN ***tcs35*** s-a identificat semnal numai pentru o singură clonă genomică (numită ***gtR1* – genomic tomato *RAD***), iar în cazul utilizării clonei ***zms1*** – 11 clone genomice (numite ***zmg1–11* – *Zea mays* genomic**). În cazul analizei clonelor genomice ***zmg*** s-a demonstrat că între unele dintre ele există omologii considerabile. Cartarea enzimatică și secvențierea parțială ne-a permis să identificăm pentru patru clone genomice ***zmg*** (***zmg1–4***) un fragment comun, în partea 3', cu dimensiunea de 2,9kb. Rezultatele secvențierii și analizei comparative au demonstrat că fragmentul identificat dispune de omologii de 90% între aceste patru clone analizate. Un interes deosebit a prezentat partea 5' a clonelor ***gtR1*** și ***zmg1–4***, pentru care au fost identificați promotorii și structura lor primară. În componența tuturor promotorilor au fost identificate secvențele TATA și prezența unor secvențe de 9 nucleotide 5'- TGGGCGGCT-3' care au fost identificate și în componența promotorului genei ***DMC1***, de la drojdii. Aceste secvențe sunt numite ***URS*** (***Universal Regulatory Site***) (Mitchell, 1994). Harta de restricție a clonelor ***zmg1–4*** este prezentată în figura 4.

Analiza comparativă a hărților restricționale, cât și a secvenței clonelor analizate, a condus la constatarea unor divergențe substanțiale în regiunile 5'. Acest fapt poate fi interpretat ca reprezentând consecința unei reglări diferențiate a expresiei acestor gene, care posibil formează o familie de gene. Cercetările ulterioare a acestor regiuni ne vor permite mai exact să identificăm rolul lor în expresia diferențiată.

În cercetările moleculare ale genelor specifice pentru organele de reproducere la plante un loc important reprezintă identificarea și analiza promotorului. Obținerea acestor informații științifice conduce la înțelegerea mecanismelor de expresie spațială a genelor analizate. Totodată, astfel de cercetări deschid noi perspective în utilizarea promotorilor specifici, sub controlul cărora pot fi exprimate gene ce produc proteine de mare valoare în ameliorare, medicină și alte domenii. Pentru a efectua cu succes asemenea

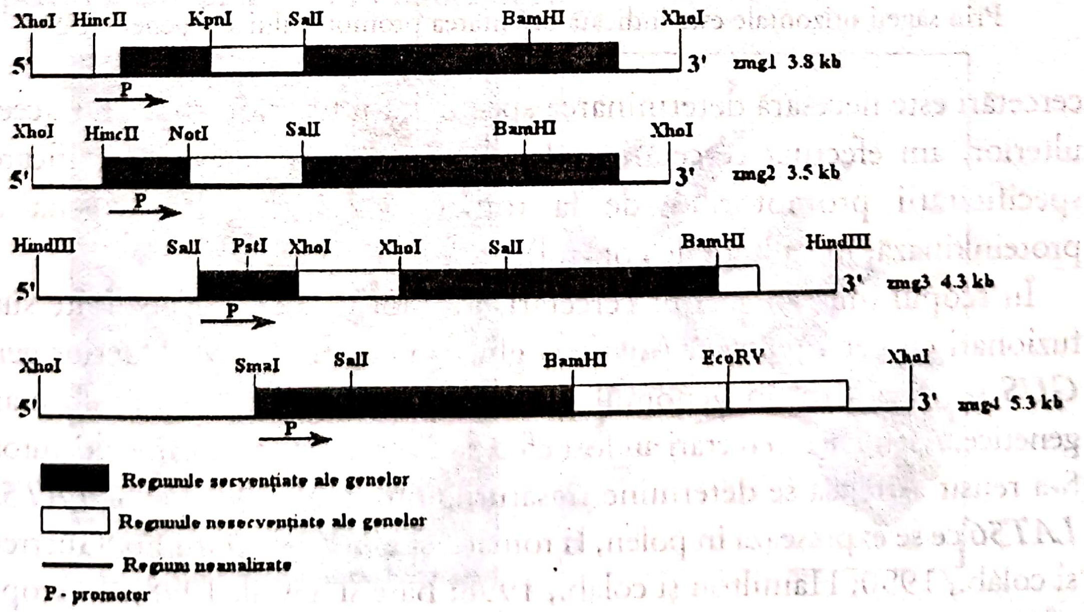

XhoI
HincII
KpnI
SalI
BamHI
XhoI
5'
3'
zmg1 3.8 kb
P
XhoI
HincII
NotI
SalI
BamHI
XhoI
5'
3'
zmg2 3.5 kb
P
HindIII
SalI
PstI
XhoI
XhoI
SalI
BamHI
HindIII
5'
3'
zmg3 4.3 kb
P
XhoI
SmaI
SalI
BamHI
EcoRV
XhoI
5'
3'
zmg4 5.3 kb
P
Regiunile secvențiate ale genelor
Regiunile nesecvențiate ale genelor
Regiuni neanalizate
P - promoter

Fig. 4 — Hărțile de restricție ale clonelor *zmg* de la porumb

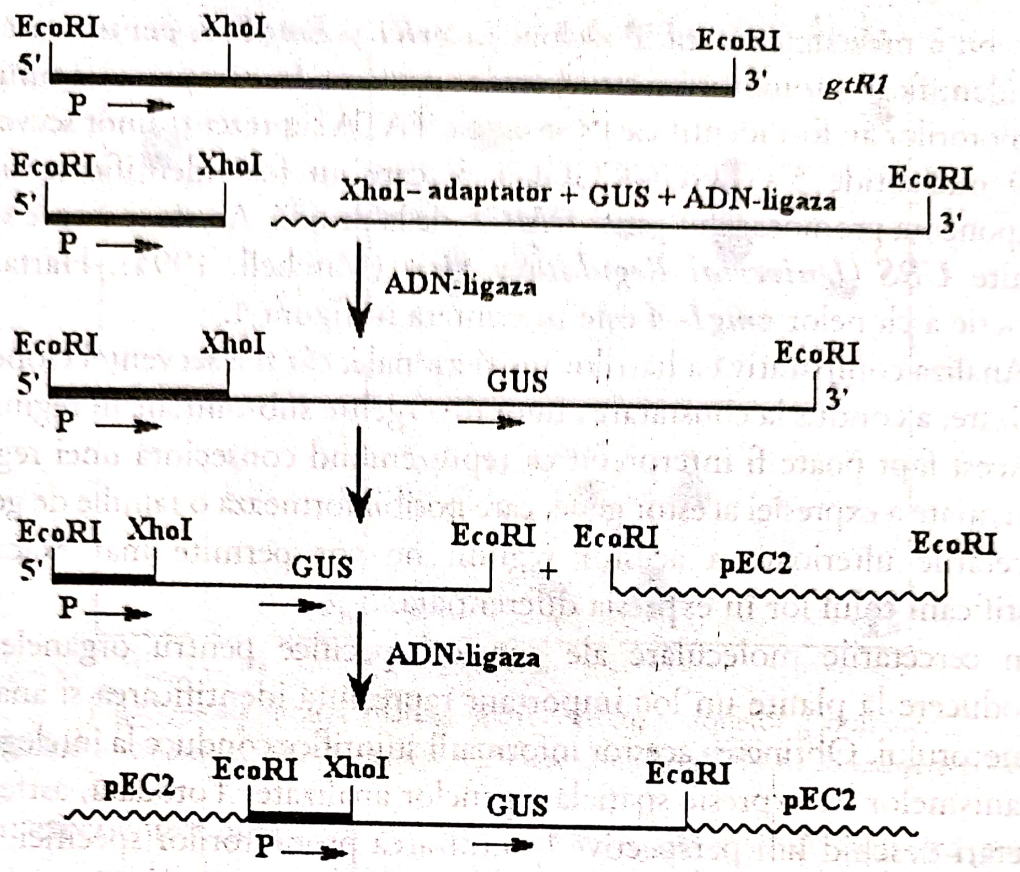


Fig. 5 — Schema obținerii construcției P-*gtr1-GUS* în vectorul binar pEC2.
P – promotorul; *GUS* – gena glucoronidazei
Prin săgeți orizontale este indicată orientarea promotorului și a genei *GUS*

cercetări este necesară determinarea specificității promotorului. De aceea, ulterior, am efectuat cercetări moleculare ce ne-au permis identificarea specificității promotorilor de la tomate ***gtR1*** și ***gtPK1*** (genă de proteinkinază, în calitate de control).

În scopul inițierii acestor cercetări, promotorii genelor analizate sunt fuzionați cu gena reporter (marker) glucoronidaza (*GUS*). Ulterior gena ***GUS*** se integrează în genomul plantei gazdă cu ajutorul transformării genetice. Asemenea cercetări au fost efectuate cu succes și de către alți autori. S-a reușit astfel să se determine trăsăturile promotorilor genelor ***LAT52, LAT56*** ce se expresează în polen, la tomate, și ***zmc13,*** la porumb (Guerrero și colab., 1990; Hamilton și colab., 1998; Bate și Twell, 1998). În scopul efectuării acestor cercetări am ales promotorii genelor care se expresează specific în organele de reproducere la tomate, însă cu durată și nivel diferite.

Aceștia sunt promotorii genei ***gtR1*** (expresie specifică în Profaza I) și genei ***gtPK1*** (expresie în organele de reproducere).

În acest caz, promotorul genelor ***gtR1*** (fragmentul **EcoRI-XhoI**) și a genei ***gtPK1*** (fragmentul **EcoRI-HindIII**) au fost fuzionați în partea 5' a genei *GUS*. În figura 5 este prezentată schema obținerii constructelor vectoriale pentru a efectua transformarea genetică a plantelor de *Arabidopsis*.

S-au utilizat constructe derivate de la *Agrobacterium* MP90 pentru transformarea genetică a plantelor de *Arabidopsis*. Circa 100 plante de *Arabidopsis*, aflate în stadiul de înflorire, au fost transformate cu constructele prezentate. Plantele respective au fost crescute până la recoltarea semințelor.

Pentru demonstrarea specificității expresiei genei ***GUS***, s-a efectuat analiza histochimică a diferitor organe ale plantelor transgenice de *Arabidopsis* (plantule, frunze, tije, antere în Profaza I a meiozei și gametofit) în etapele principale de dezvoltare. Analiza histochimică a demonstrat expresia genei ***GUS*** fuzionată cu promotorul ***gtR1*** în anterele plantelor transgenice de *Arabidopsis*, la stadiile Profazei I a meiozei. Se poate deduce că promotorul genei respective este specific, iar genele aflate sub controlul acestuia se exprează în antere în stadiile Profazei I a meiozei. Rezultatul acestor experiențe este prezentat în figura 6, A.

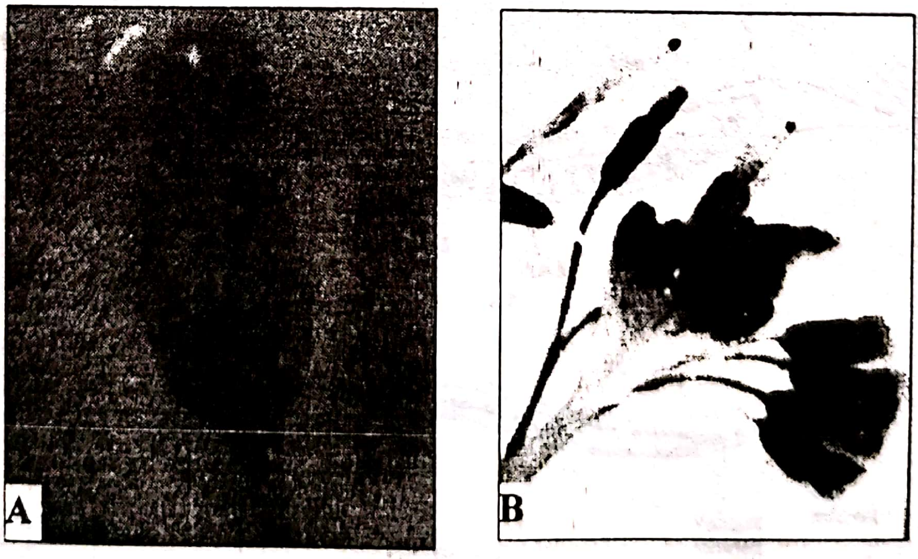


Fig. 6 — Analiza histochimică a genei *GUS* aflată sub controlul promotorilor genelor *gtR1* (A) și *gtPK1* (B)

Totodată, activitatea funcțională a genei *GUS* sub controlul promotorului genei ***gtPK1*** s-a dovedit a fi atât în organele de reproducere, la toate stadiile de dezvoltare, cât și în rădăcini. Nivelul de expresie, în acest caz, a fost destul de înalt (figura 6, B).

Aceste cercetări ne-au permis să stabilim specificitatea înaltă a promotorului ***gtR1*** care, la rândul său, se manifestă printr-o expresie specifică în antere, aflate la stadiile profazei I din meioză la tomate. În cazul promotorului genei ***gtPK1*** s-a demonstrat o expresie destul de efecientă a genei *GUS*, însă, în același timp, nu s-a evidențiat o specificitate înaltă. Rezultatele ne conduc la ideea că astfel de promotor poate fi utilizat în expresia specifică a genelor implicate în producția de proteine importante, în diferite ramuri ale biotehnologiei.

Clonarea și cercetarea moleculară a unor gene specifice sistemului reproducător vegetal ne va permite pe viitor să înțelegem mai profund mecanismele de reglare a expresiei diferențiate temporale și spațiale ale acestora, cu posibilități ulterioare legate de amelioare și agrotehnică.

CAPITOLUL XL

MODELUL GENOMIC *CAENORHABDITIS ELEGANS*

1. INTRODUCERE

Caenorhabditis elegans este un organism eucariot întâlnit în multe regiuni ale lumii, în habitate cu temperaturi scăzute, având o organizare anatomică, fiziologică și genetică extrem de simplă. Este un vierme cilindric de dimensiuni mici, un adult atingând o lungime de aproximativ 1mm. Există două forme sexuale ale acestui nematod: hermafrodit (similar sexului femel) și mascul (se întâlnește mai rar).

C. elegans este foarte ușor de crescut în laborator, în condiții optime obținându-se o nouă generație la un interval de trei zile. În evoluția sa

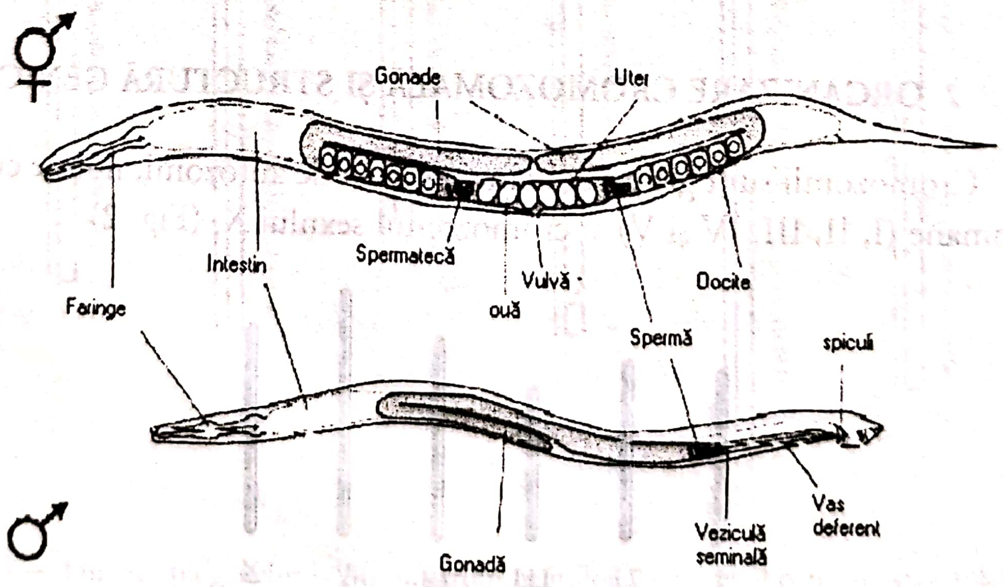

⚥
Gonade
Uter
Intestin
Spermatecă
Vulvă
Oocite
Faringe
ouă
Spermă
spiculi
Vas deferent
Veziculă seminală
Gonadă
♂

Fig. 1 — Adultul de *C. elegans* hermafrodit (sus) și mascul (jos).

ontogenetică, viermele parcurge șase stadii de dezvoltare: ou, 4 stadii larvare (L1–L4) și adult.

În anul 1965, acest nematod a fost ales ca model de studiu, ca urmare a studiilor efectuate de către Sydney Brenner în scopul elucidării unor probleme legate de anatomie, genetică, biologia dezvoltării și comportament.

Numărul mare de metode care au permis analiza acestui organism precum și informațiile acumulate cu privire la organizarea și modul său de viață, a făcut ca *C. elegans* să fie, probabil, metazoarul cel mai bine cunoscut din punct de vedere al organizării structurale și genetice, al dezvoltării și al comportamentului.

Alegerea lui *Caenorhabditis elegans* ca model de studiu a fost determinată în primul rând de simplitatea organizării anatomice și genetice. Genomul său este de dimensiuni mici, conținând 97Mb, ceea ce reprezintă 1/30 din mărimea genomului uman. Secvențierea completă a acestui genom a fost încheiată în luna Decembrie a anului 1998 și a reprezentat prima secvențiere a unui organism eucariot pluricelular. Numărul mic de cromozomi (cinci perechi de autozomi și cromozomul X) a constituit, de asemenea, un avantaj.

Totodată, *C.elegans* a reprezentat și un sistem pilot pentru realizarea hărții fizice a unui număr mare de genomuri vegetale și animale și, ulterior, pentru secvențierea completă a acestora.

2. ORGANIZARE CROMOZOMALĂ ȘI STRUCTURĂ GENICĂ

Cromozomii sunt grupați în cinci perechi de autozomi, notate cu cifre romane (I, II, III, IV și V) și cromozomul sexului X. (Fig. 2)

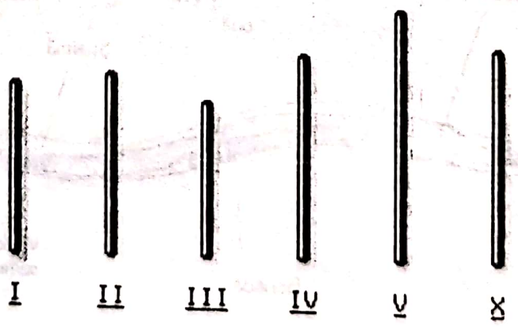


Fig. 2 — Reprezentarea grafică a cariotipului (**idiograma**) *Caenorhabditis elegans.*

Spre deosebire de cromozomii altor specii, cromozomii acestui organism sunt mici și de dimensiuni apropiate, ceea ce îngreunează realizarea unui cariotip. O altă particularitate a cromozomilor acestui organism este aceea că cromatidele surori nu sunt unite la nivelul centromerului, ca în cazul altor organisme eucariote, ci sunt unite pe toată lungimea lor, astfel încât orice regiune a cromozomului poate fi considerată centromer. Acest tip de cromozomi au primit denumirea de „*cromozomi holocentrici*".

O caracteristică a genomului la *C. elegans* este uniformitatea procentului de GC, la nivelul tuturor cromozomilor, de 36%, precum și remarcabila sa compactare genică în regiunile centrale ale autozomilor. La nivelul cromozomului X, genele au o distribuție uniformă (fig. 3).

Elementele direct și invers repetate sunt mai frecvente în brațele autozomale, comparativ cu regiunile centrale și cromozomul X.

Compactarea genomului este realizată prin mai multe moduri. Intronii și distanțele intergenice sunt neobișnuit de mici; aproximativ 25% din gene sunt transcrise în unități policistronice. Distanța dintre gene este de

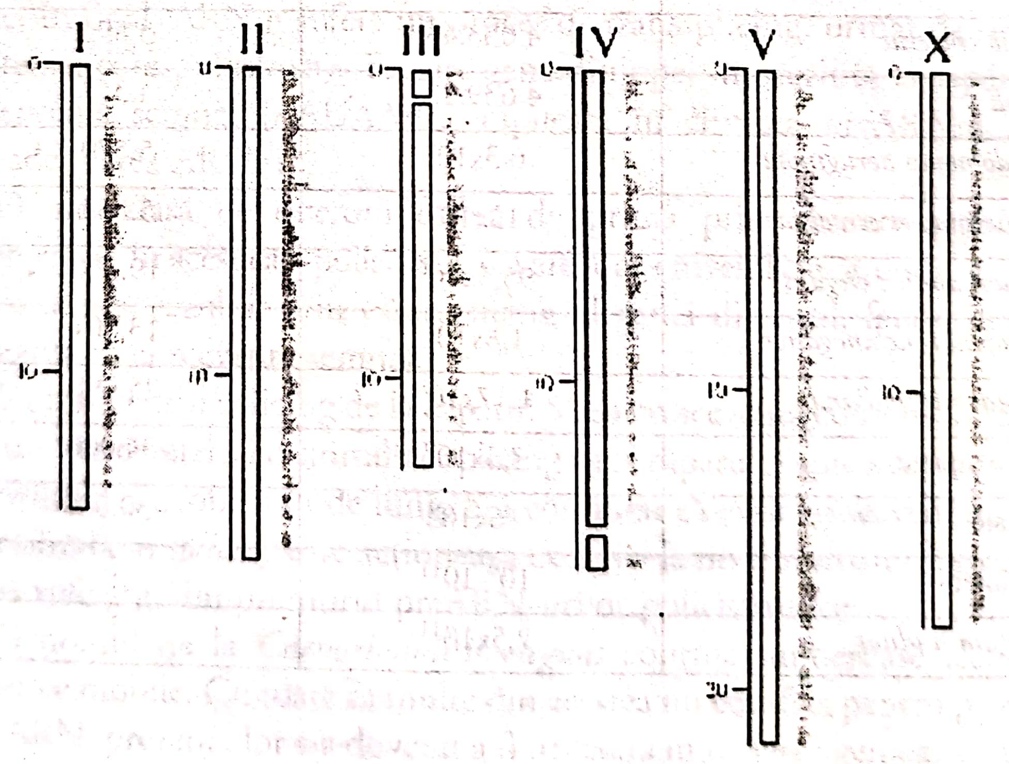


Fig. 3 — Distribuția genelor la nivelul cromozomilor. Se observă concentrarea acestora în regiunile centrale ale autozomilor, precum și uniformizarea lor la nivelul cromozomului X.

aproximativ 100 pb, însă există și cazuri în care nu se poate face o delimitare între gene, situații cunoscute sub denumirea de *„gene în gene“*.

Numărul genelor estimate este de aproximativ 19.800, (tabel 1), după alți autori 19.099, acest număr fiind mult mai mare decât cel presupus prin studii de genetică clasică. Aproximativ 12.000 din aceste gene au funcție încă necunoscută, iar 40% din genele prezise au fost parțial confirmate cu ajutorul EST-urilor (secvențe etichetă de exprimare), acestea reprezentând porțiuni genice și nu gena, în întregime (Wilson, 1999).

Tabel 1 Dimensiunea comparativă a genomului la unele virusuri, procariote și eucariote.

Specie	Dimensiune genom	Număr de gene
φx174	5.386	10
Epstein Barr Virusul (EBV)	172.282	37
Borellia burgdorferi	$1,44 \times 10^6$	1.738
Vibrio cholerae	4.033.460	3.890
E. coli	4.639.221	4.377
Pseudomonas aeruginosa	$6,3 \times 10^6$	5.570
Saccharomyces cerevisiae	12×10^6	5.885
Caenorhabditis elegans	$95,5 \times 10^6$	19.820
Drosophila melanogaster	$1,8 \times 10^8$	13.601
Arabidopsis thaliana	$1,17 \times 10^8$	25.498
Homo sapiens	$3,3 \times 10^9$	~34.000?
Cereale	16×10^9	~30.000
Amfibieni	10^9-10^{11}	?
Psilotum nudum	$2,5 \times 10^{11}$	?

Genele au o structură mozaicată, secvențele exonice fiind separate de cele intronice. Fiecare genă are în medie 5 introni și o lungime de aproximativ 5kb. La nivelul exonilor se găsește 27% din secvența genomică.

Exonii au o lungime de 80–250pb, iar intronii sunt mai scurți, având în general o lungime de 48pb; cel mai mic intron descris are o lungime de 30pb, iar cel mai mare — 18kb (Sibley și colab., 1993). Spre deosebire de genele de la alte animale, unde promotorul se află la capătul 5' al primului exon, în cazul genelor de la *C. elegans*, acesta se află la capătul 5' al unei secvențe numite „***outron***". Aceasta este o secvență ***intron-like***, situată la nivelul preARNm, care este modificată prin transsplicing. Datorită acestei modificări, este greu de stabilit exact capătul 5' terminal al unei gene și, în consecință, lungimea sa.

Aproximativ 25% din gene sunt organizate în operoni (grupuri de gene cotranscrise). Cu toate că genele eucariote sunt transcrise de obicei individual, monocistronic, la *C.elegans* există gene transcrise policistronic. Se consideră că în operon sunt cuprinse doar două gene, dar au fost descrise și situații în care la nivelul unui operon apar șase gene. Transcrierea genelor are loc prin cuplarea ARN-polimerazei la nivelul unicului promotor situat în regiunea din amonte a primei gene. ARN premesager policistronic va fi procesat (clivat) în ARNm-uri monocistronice, corespunzătoare fiecărei gene. În final, ARNm suferă un proces de transsplicing, urmat de sinteza proteinei corespunzătoare. Fiecare genă din operon prezintă la capătul 3' o secvență semnal (AAUAAA), implicată în clivarea preARNm și în poliadenilarea ARNm.

O altă clasă de operoni diferă de prima prin absența regiunilor intergenice. In acest caz, poliadenilarea are loc la nivelul capătului 3' al genei din amonte, rezultat prin transsplicing-ul genei din aval, fără a implica existența unei secvențe semnal.

Situsul pentru splicing de la capătul 5' este o secvență consens, întâlnită la toate vertebratele, iar situsul de splicing de la capătul 3' este înalt conservat în evoluție și neobișnuit de lung. S-a constatat că există o secvență *leader*, specializată în *splicing* care acționează exclusiv la nivelul situsurilor pentru trans-splicing, din interiorul preARN-urilor policistronice.

Genomul de la *Caenorhabditis elegans* conține numeroase elemente genetice mobile. Cu toate că multe din acestea nu codifică pentru proteine sau ARN, prezența lor s-a dovedit a fi necesară în reglarea genică, replicare și în rearanjamentele cromozomale. Aceste elemente repetitive pot fi considerate ca repetiții locale (de exemplu: repetiții în tandem, directe sau inversate) sau repetiții dispersate. Repetițiile în tandem reprezintă 2,7%

din genom și se găsesc la o distanță de 3,6kb, una de alta; repetițiile inversate reprezintă 3,6% și se găsesc la o distanță de 4,9kb, una de alta. Densitatea repetițiilor inversate este de 55%, în regiunile intergenice. La nivelul întregului genom, aceste repetiții locale sunt distribuite neuniform, unele sunt solitare, iar altele sunt grupate în familii. Există 38 de familii de elemente invers repetate, multe dintre acestea corespunzând elementelor ***transpozon-like***. Multe dintre aceste familii se consideră că sunt relicve ale unor familii de transpozoni care nu au fost mult timp activi.

Exemple de familii de elemente repetate:

- CeRep 26 și CeRep 27 — reprezentate de repetiții telomerice care nu se găsesc la nivelul intronilor;
- CeRep 11 — este alcătuită din 712 copii, una dintre acestea găsindu-se la nivelul cromozomului X.

La *C. elegans* au fost descoperite și elemente transpozabile invers repetate miniaturale (elemente ***MITE-like***). Acestea sunt fragmente mici, cu o lungime de până la 500 pb, întâlnite într-un număr mare de copii, în multe genomuri eucariote. Ele sunt grupate în 4 familii și reprezintă 1–2% din genom. Elementele MITE identificate și studiate la *C. elegans* au fost denumite: *Cele 1*, *Cele 2*, *Cele 14* și *Cele 42*. Intre aceste elemente există o diferență în ceea ce privește profilul de distribuție la nivelul cromozomilor. De exemplu, s-a observat că *Cele 14* formează clustere în apropierea brațelor autozomilor, în timp ce *Cele 2* este distribuit la nivelul domeniilor centrale autozomale, fără a se evidenția gruparea lor în clustere la nivelul capetelor cromozomale. O trăsătură remarcabilă a distribuției profilelor este furnizată de cromozomul X care nu prezintă decât una din cele patru familii, respectiv *Cele 14*, absența celorlalte trei familii fiind o dovadă a funcționării mecanismului de compensație de doză. In interfază, nivelele de expresie ale genelor X-lincate, în cazul cariotipului XX, trebuie să fie redus la jumătate pentru a fi echivalent cu condiția cariotipică XO. Existența unei similitudini între MITE și transpozonii autonomi de clasă 2, atât la nivelul secvențelor terminale invers repetate (TIR), cât și în selecția situsului țintă, a condus la ideea că aceste fragmente reprezintă forme neautonome ale elementelor transpozabile ADN.

Nu se cunoaște rolul evolutiv al acestor elemente, dar s-a sugerat că ele ar putea furniza secvențe reglatorii pentru o varietate de gene.

Pe lângă aceste elemente mobile, a fost identificat și un număr mare de segmente duplicate a căror dimensiune se întinde de la sute de baze la zeci de kilobaze.

Secvențierea genomului *C. elegans* a dus la descoperirea unui număr de aproximativ 19.000 de gene care codifică pentu ARN și diferite tipuri de proteine cu funcții multiple (numărul acestor proteine este de aproximativ 20.000).

La *C. elegans* au fost studiate gene care codifică pentru proteine ce prezintă sau nu omologie cu proteinele altor organisme; genele pentru ARNt (44% din acestea se găsesc în cromozomul X, care are un conținut genic de 20% din valoarea totală a genomului); gene pentru ARNr (genele pentru ARN 5,8S se găsesc în cromozomul I, iar cele pentru ARN 5S, în cromozomul V); gene implicate în controlul dezvoltării (genele homeotice), în determinarea sexului etc. Dintre acestea, cel mai mult studiate au fost ultimile două categorii, datorită, pe de o parte, faptului că este implicat un număr foarte mare de gene care cooperează și se condiționează reciproc, iar, pe de altă parte, din necesitatea explicării mecanismelor complexe care stau la baza realizării acestor procese.

3. GENE IMPLICATE ÎN DETERMINAREA SEXULUI

C. elegans este un organism care există în două forme sexuale: hermafrodit (XX) și mascul (XO) (se întâlnește foarte rar). Anatomic, indivizii hermafrodiți sunt similari femelelor.

Studiile de genetică clasică au evidențiat existența unui număr mare de loci genici implicați în determinarea sexului. Genele de la nivelul acestor loci se găsesc în număr mare și se influențează reciproc. Semnalul primar în determinarea sexului este reprezentat de raportul dintre cromozomul X și cromozomii autozomi (X/A), (Nigon, 1949; Hodgkin și colab., 1979; Madl și Herman, 1979). Acest „cod“ este folosit atât în determinarea sexului, cât și în inducerea mecanismului compensației de doză. Semnalul este trecut printr-un lanț de cascade de traducere, existând o serie de interacții care culminează cu exprimarea genelor specifice sexului.

Ambele sexe sunt diploide, masculul având un singur cromozom X, raportul X/A=0,5 și un număr de 11 cromozomi, iar indivizii hermafrodiți au doi cromozomi X, raportul X/A fiind, în acest caz, dublu, respectiv egal cu 1. Tranziția de la o valoare la alta a raportului este determinată de restructurările cromozomale, reprezentate de duplicații și deleții, la nivelul cromozomului X. Duplicațiile duc la feminizarea animalelor XO sau determină moartea acestora, ca urmare a unui nivel scăzut de transcripte X. Similar, delețiile determină masculinizarea și posibil moartea indivizilor XX, datorită unui nivel al transcriptelor X mai mare decât cel normal.

În anul 1994, Akerib și Meyer au arătat că aceste restructurări au loc la nivelul capătului stâng la cromozomului X.

În același an, Hodgkin și colaboratorii au identificat un element care este, probabil, implicat în aceste modificări structurale, pe care l-au numit *fox-1* (*feminizing locus on X*), situat în regiunea 3 a capătului stâng al cromozomului X.

În anul 1997, Nicoll și colaboratorii au identificat două tipuri de mutații la nivelul genei *fox-1* care stabilesc valoarea raportului: leziunile (delețiile) determină masculinizarea, iar duplicatiile determină sexul hermafrodit (feminizarea).

În apropierea centrului cromozomului X a fost identificată o genă desemnată *sex-1* (*signal element on X*) a cărei mutație *loss-of-function* (pierdere de funcție), în cazul indivizilor XX și *gain-of-function* (câștigare de funcție), în cazul indivizilor XO, determină masculinizarea, respectiv feminizarea, precum și o letalitate parțială a acestora. Animalele dublu homozigote, pentru *fox-1* și *sex-1,* au o letalitate de 100%; homozigoții pentru *fox-1* au o viabilitate normală, iar cei pentru *sex-1* prezintă o letalitate parțială. Aceste observații au dus la concluzia că *fox-1* și *sex-1* au efecte cumulative în stabilirea raportului X/A. Există păreri, potrivit cărora, în stabilirea acestui raport sunt implicate și elemente semnal, de la nivelul autozomilor.

Dezvoltarea liniei germinale și expresia genelor de pe cromozomul X sunt controlate, prin compensație, de un număr de gene situate tot la nivelul acestui cromozom și care acționează împreună, prin mecanisme încă necunoscute.

Genele implicate în determinarea sexului au fost divizate în:

- Gene implicate atât în determinarea sexului, cât și în compensația de doză;
- Gene implicate în determinarea sexului, dar nu în compensația de doză.

Din prima categorie a fost descoperită o genă considerată esențială în determinare, desemnată *xol-1* (**XO** lethal). Mutația *loss-of-function* a acestei gene determină moartea indivizilor XO, cu dezvoltarea condiției hermafrodite (Miller și colab., 1988). Gena *xol-1* poate fi considerată o genă „*master*“ (stăpână), a cărei activare determină dezvoltarea sexului mascul. Indivizii XX prezintă gena *xol-1* inactivă. La animalele XO, *xol-1* pare să acționeze prin represia activității a trei gene *sdc* (*sex and dosage compensation*). În acest caz, gena *xol-1* produce în cantitate mare proteina XOL-1 care acționează ca un represor , inhibând în special activitatea genei *sdc-2*. Mutațiile *loss-of-function* în *sdc-1* și *sdc-2* și orice mutație la nivelul lui *sdc-3* determină masculinizarea animalelor XX, acestea având un nivel scăzut de transcripte X-lincate (Nusbaum și Meyer. 1989; Villeneuve și Meyer, 1990; DeLong și colab., 1993). La animalele XX, activitatea genei *xol-1* este supresată de produșii genelor *sdc*.

Nu este cunoscut rolul exact al genei *sdc-3* în determinarea sexului. La nivelul acestei gene au loc mutații care afecteză determinarea sexului, dar nu influențează dozajul (*sdc3*(*TRA*)), precum și mutații care afectează compensația, dar nu au efecte în determinare (*sdc3*(*Dpy*)). Mutațiile *Tra* și *Dpy* ale genei *sdc-3* afectează porțiuni ale proteinei codificată de aceasta, ceea ce sugerează că domenii separate pot fi implicate în realizarea unor funcții independente. Mutația *Dpy* elimină două motive „*Zinc finger*“ din capătul carboxi terminal al proteinei SDC-3, iar *Tra* afectează un domeniu de legare a ATP. Motivele „*Zinc finger*“ sunt necesare în legarea proteinei la unul din cei doi cromozomi X, pe care îl inactivează (Davis și Meyer, 1997). Motive „*Zinc finger*“ se găsesc și în structura SDC-1, prin intermediul cărora interacționează cu ADN.

Gena *xol-1* este reglată prin mai multe moduri. Un model de reglare este oferit de gena *sex-1*. Produsul acesteia, SEX-1, acționează ca un represor transcripțional, legându-se direct la promotorul genei *xol-1*. Elementele din regiunea 1 a capătului stâng al cromozomului X sunt implicate în reglarea acestei gene, însă nu se știe dacă cele din regiunile 2 și 3 îndeplinesc această funcție.

În a doua categorie este inclus un număr mare de gene grupate pe direcții de dezvoltare: gene implicate în determinarea somatică a sexului, în determinarea liniei germinale sexuale, cu dezvoltarea ca mascul sau ca hermafrodit.

4. DETERMINAREA SOMATICĂ A SEXULUI

La nivelul organismului există o serie de semnale prin intermediul cărora celulele se influențează reciproc. Celulele somatice prezintă o cascadă de astfel de semnale care „ajută“ celulele sexuale în luarea deciziei de dezvoltare.

În determinarea somatică a sexului este implicat un număr mare de gene între care au loc interacții pozitive (de activare) și negative (inhibitorii), reprezentate schematic în figura 4.

Genele *sdc* determină sexul XX și datorită nivelului scăzut de exprimare a genei care condiționează sexul mascul, desemnată *her-1* (*hermaphroditization*). Pierderea funcției *her-1* determină transformarea animalelor XO în XX, iar dacă mutația are loc în organismele XX, nu are efect, de unde s-a ajuns la concluzia că *her-1* este esențială în determinarea somatică a

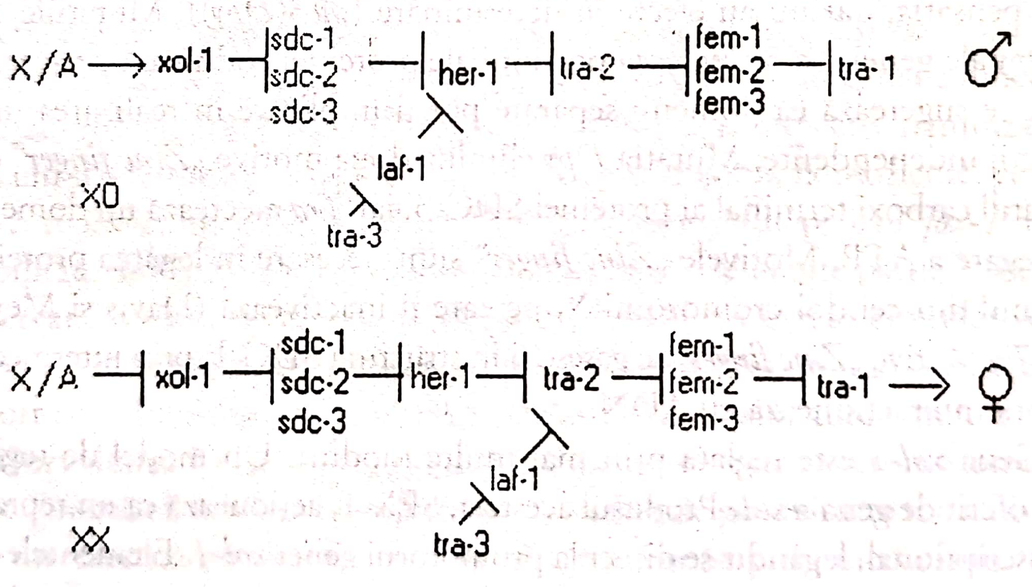


Fig. 4 — Interacții genice implicate în determinarea somatică a sexului. Săgețile reprezintă interacții pozitive, iar barele verticale, interacții negative sau inhibitorii. Genele scrise cu caractere deschise sunt implicate în stabilirea trăsăturilor masculine, iar cele cu caractere accentuate, în stabilirea trăsăturilor caracteristice sexului femel.
In figură sunt schematizate cele două modele de activare a genelor care duc la promovarea sexului mascul (sus), și femel (jos).

sexului XO. Activitatea genei la indivizii XX este inhibată de produșii *sdc-1* sau *sdc-2*. Gena este activă atâta timp cât genele *sdc* sunt inhibate, acest fenomen având loc în cazul indivizilor XO. Proteina HER-1 are o secvență semnal care acționează ca ligand, legându-se de receptori de la suprafața celulei (Perry și colab., 1993). Dacă într-o celulă care ar trebui să se dezvolte ca XO, raportul X/A este citit greșit, cu declanșarea semnalelor ce promovează sexul XX, proteina HER-1, din celulele învecinate, poate bloca semnalul anterior, determinând dezvoltarea corectă a sexului.

O altă genă implicată în determinarea somatică a sexului este *tra-2*. Produsul său prezintă un domeniu transmembranar, la nivelul căruia se leagă HER-1, și un capăt carboxi terminal intracelular. In indivizii XO, HER-1 este inactivat prin legarea la TRA-2, ceea ce permite dezvoltarea acestui sex; blocarea legării lui HER-1 la TRA-2 duce la activarea lui TRA-2 care la rândul său blochează activitatea unei alte gene, *fem-3*, situată împreună cu gena *tra-1*, în aval față de *tra-2*. Mutațiile *gain-of-function* ale genei *tra-2* sunt datorate unor leziuni moleculare, la nivelul regiunii 3' netranslatate (3'UTR) (Goodwin și colab., 1993) blocând producerea spermatocitelor la hermafrodiți. Regiunea 3'UTR a acestei gene conține două repetiții directe (DRE) de 28 de nucleotide care sunt legate direct la un factor (DRF) care inhibă translația (Goodwin și colab., 1993). În felul acesta, are loc o reglare a *tra-2*, la nivel translațional. O proteină care este un posibil component al acestui factor este codificată de gena *laf-1* (*lethal and feminized*), care este specifică determinării sexului mascul.

Există trei gene fem: *fem -1*, *fem-2*, *fem-3*. Pierderea funcției acestora determină feminizarea XO. Gena *fem-1* codifică pentru o proteină cu motive **ankirin** și care este implicată în interacția proteină-proteină; *fem-2* codifică pentru o serin/treonin fosfatază (Pilgrim și colab., 1995; Chin-Sang și Spence, 1996), cu un capăt aminoterminal neobișnuit de lung, iar *fem-3* codifică pentru o proteină care este probabil necesară determinării sexului mascul. Aceste trei proteine acționează împreună, formând un complex proteinic.

Proteina FEM își imprimă caracterele de masculinizare, prin inhibarea genei *tra-1*, care este specifică sexului hermafrodit. Gena *tra-1* codifică pentru două proteine diferite (Zarkower și Hodgkin, 1992). Proteina mică conține două motive zinc, pe când cea mare conține cinci astfel de motive; aceste motive favorizează interacția cu ADN.

Gena *tra-1* pare să fie reglator terminal global al determinării somatice a sexului. Atât domeniile *„zinc finger"* ale proteinei TRA-1, cât și capacitatea proteinei mari, codificată de *tra-1,* de a lega ADN in vitro, (Zarkover și Hodgkin, 1993) este un argument că TRA-1 funcționează ca un reglator transcripțional care controlează expresia genelor sex specifice.

5. DETERMINAREA LINIEI GERMINALE SEXUALE

5.1. DETERMINAREA SEXULUI HERMAFRODIT

În linia germinală hermafrodită, spermatocitele și apoi ovocitele, sunt produse în aceeași regiune a celulelor germinale precursoare. Decizia pentru diferențierea ca spermatocite sau ca ovocite este reglată de către genele sex-determinatoare, una dintre acestea fiind gena *fem-3.* Expresia *fem-3* în linia germinală hermafrodită condiționează spermatogeneza și este necesar să fie reglată negativ, pentru desfășurarea ovogenezei. La adultul hermafrodit, cele mai multe ARN-uri pentru *fem-3* sunt identificate în linia germinală.

Producerea gameților în linia germinală hermafrodită are loc în două faze separate temporal: spermatogeneză și ovogeneză. Separarea acestora este posibilă, în primul rând, datorită faptului că reglatorii terminali ai sexului diferă în linia germinală de cei din linia somatică. Gena *tra-1* este reglatorul terminal în celulele somatice și funcționează prin inducerea trăsăturilor femele, atunci când este activă, și permite dezvoltarea sexului mascul, atunci când este inactivă. In linia germinală, *tra-1* este necesară pentru continuarea spermatogenezei, deci nu mai funcționează ca un reglator terminal. In linia germinală hermafrodită, această funcție este îndeplinită de cele trei gene *fem.* Genele *fog -1* și *fog-2,* (***feminization of the germ line***) care, aparent, nu au rol somatic, cooperează cu genele *fem* în inducerea spermatogenezei (Barton și Kimble, 1990; Ellis și Kimble, 1995). Genele *fem-1, -2, -3, fog-1* și *-3* au fost numite împreună *tgf (**terminal germ line fems and fogs**).* Pentru ca spermatogeneza să aibă loc, aceste gene trebuie să fie active. Activitatea lor este dependentă de inactivarea genei *tra-2.* Un posibil mecanism pentru inactivarea genei *tra-2* în linia germinală hermafrodită implică o a treia genă *fog,* și anume gena *fog-2* care este situată în regiunea din amonte față de genele *tgf* (Schedl și Kimble, 1988) și acționează prin modificarea activității *tra-2* sau a uneia sau mai multor gene *tgf*, cu promovarea spermatogenezei.

Gena *laf-3* poate fi implicată în medierea reglării prin regiunea 3'UTR a genei *tra-2,* prin legarea DRF, iar *tra-3* poate bloca funcția *laf-1,* în al doilea și al treilea stadiu larvar al dezvoltării hermafrodite. Legarea proteinei GLD-1 la regiunea 3'UTR a genei *tra-2* împiedică translația acesteia. Analiza genetică a genei *gdl-1* arată că aceasta este necesară în ovogeneză, ca de altfel și în promovarea spermatogenezei, la hermafrodite. Un alt mecanism de reglare a genei *tra-2* la hermafrodiți poate implica existența unor semnale emise de celulele somatice. Aceste celule pot secreta un ligand care acționează ca un inhibitor, legându-se la proteina TRA-2, similar modului de acțiune al lui HER-1, în celulele somatice masculine.

Șase alte gene, desemnare *mog-1*, *mog-2*, *mog-3*, *mog-4*, *mog-5* și *mog-6* (*masculinization of the germ line*) sunt implicate în producerea ovocitelor. În contrast cu genele *fog*, mutațiile *loss-of-function* ale genelor *mog*, determină masculinizarea.

Pe baza studiilor acestor gene și a relațiilor care se stabilesc între ele, s-a putut evidenția modul de desfășurare al celor două etape: spermatogeneza și, respectiv, ovogeneza (Fig.5). După cum s-a mai arătat, aceste două etape sunt separate temporal, în sensul că mai întâi are loc spermatogeneza și, numai după ce aceasta este completă are loc și ovogeneza.

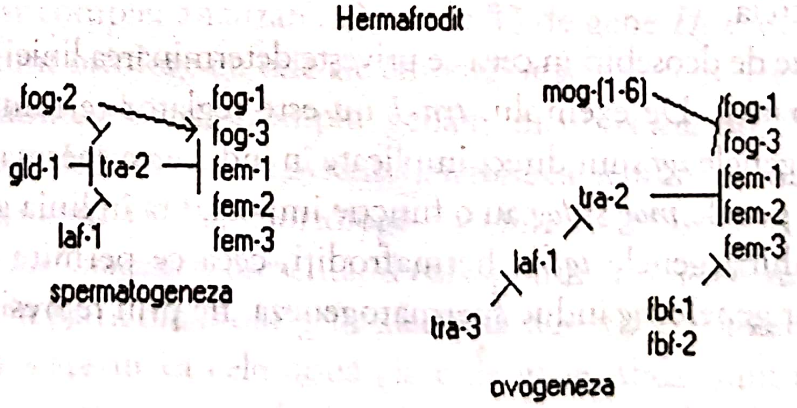


Fig. 5 — Determinarea sexului hermafrodit. Pentru desfășurarea normală a spermatogenezei, este nevoie ca gena *tra-2* să fie inactivă pentru a permite funcționarea genelor *tgf.* După o perioadă de timp, genele *tgf* sunt inactivate, iar genele *fgf* blochează transcrierea genei *fem-3,* ceea ce permite tranziția de la spermatogeneză la ovogeneză.

5.2. DETERMINAREA LINIEI GERMINALE MASCULINE

Determinarea liniei germinale masculine implică un număr mai mic de gene, însă, acest proces se bazează pe aceleași relații de interdependență. Gene care în linia germinală hermafrodită erau active, în linia germinală masculină este necesar să se găsească în condiție inactivă, pentru o dezvoltare normală a acestui sex.

Inducerea și menținerea spermatogenezei la sexul mascul necesită activitatea continuă a genei *her-1* (Fig.6). Produsul acesteia se leagă de produsul genei *tra-2* pe care o inhibă, împiedicând astfel dezvoltarea sexului XX. Mutațiile *loss-of-function* ale genei *fog-2* determină feminizarea în linia germinală hermafrodită cu desfășurarea normală a spermatogenezei (Schedl și Kimble, 1988). Legarea lui HER-1 la TRA-2 reprezintă mecanismul primar al inhibării lui TRA-2, care astfel este incapabilă să inhibe genele *tgf*. Pierderea funcției oricărei gene *fem* determină feminizarea indivizilor XO, atât în linia somatică cât și în cea germinală, în timp ce același tip de mutație în genele *fog-1* și *fog-3* determină feminizarea. Aceste observații au dus la concluzia că toate cele cinci tipuri de gene sunt necesare pentru spermatogeneza la mascul și hermafrodit. Pentru că în regiunea din aval a genelor *tgf* nu se găsesc alte gene, acestea sunt considerate reglatori terminali ai dezvoltării liniei germinale masculine. Aceste gene pot fi implicate în promovarea spermatogenezei sau inhibarea ovogenezei, sau în ambele. Gena *tra-1* este implicată în menținerea spermatogenezei și nu în inducerea acesteia.

Există o serie de deosebiri în ceea ce privește determinarea liniei germinale sexuale și somatice. De exemplu: *tra-1* nu este reglator terminal în linia germinală, iar genele *tgf* sunt direct implicate în inducerea spermatogenezei. De asemenea, genele *mog* și *fog* au o funcție importantă în linia germinală; genele *mog* inhibă genele *tgf* la hermafrodiți, ceea ce permite inducerea ovogenezei, iar genele *fog* induc spermatogeneza, fie prin represia *tra-2*, în

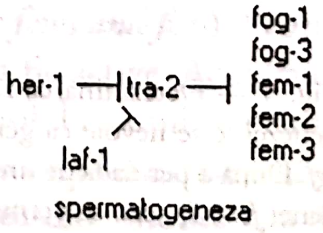


Fig. 6 — Determinarea sexului mascul. Genele *her-1* și *laf-1* represează activitatea genei *tra-2*, permițând astfel funcționarea genelor *tgf* și inducerea spermatogenezei.

linia germinală hermafrodită (*fog-2*), fie prin cooperarea cu genele *fem*, în ambele sexe (*fog-1* și *fog-3*)

De asemenea, există diferențe în mecanismele de control al celor două linii, în ambele fiind implicate relații epistatice bazate pe interacții negative.

6. GENE CARE CODIFICĂ FACTORI TRANSCRIPȚIONALI, CU ROL ÎN CONTROLUL DEZVOLTĂRII

Genele HOX codifică pentru factori transcripționali cu grad înalt de conservare care controlează segmentele identității organelor și diferențierea țesuturilor, ca și simetria axului antero-posterior, probabil, la toate metazoarele cu simetrie bilaterală. La embrionii nevertebratelor, altele decât *Drosophila melanogaster*, funcția genelor *Hox* rămâne necunoscută, cu excepția deducerii similitudinii de secvență și a modelelor de exprimare

Familia genelor *Hox* mediază o varietate de evenimente, în timpul dezvoltării embrionare și se caracterizează structural prin prezența unei regiuni numită homeobox care codifică o secvență numită homeodomeniu, alcătuită din aproximativ 60 de aminoacizi care formează 3 α-helixuri, împachetate într-o structură globulară. Expresia genelor *Hox* este diferită, în diferite momente ale dezvoltării, precum și în diferite tipuri celulare. Studiile genetice au arătat că genele homeobox reprezintă aproximativ 1/10 din genele implicate în controlul dezvoltării și că aproximativ 25% din aceste gene au fost complet analizate. Din cele 83 de gene *Hox* identificate la *C. elegans*, 5 sunt ortologe cu cele ale cordatelor și altor nevertebrate, precum și cu ale mamiferelor, de exemplu: gena homeobox *unc 86*, de la *C. elegans* și gena *Brn-3*, de la mamifere mediază maturarea neuronilor mecanosenzitivi. Alte 7 gene sunt probabil ortologe cu clusterii Hox de la vertebrate și *Drosophila melanogaster*, prezentând corespondențe cu cele de la *C. elegans*.

Mutații în patru din aceste gene afectează simetria axei antero-posterioare.

Inițial s-a crezut că cele două clase de gene AbdB sunt absente la *C. elegans*, însă analizele genetice au arătat că acestea au o localizare foarte apropiată, fiind suprapuse pe o distanță de 5 kb, sugerând că există o genă nouă rezultată în urma unui fenomen de duplicație genică.

Genele *Hox* la *C.elegans* sunt situate în același cromozom, dar dispersate. Absența clusterilor *Hox* este o particularitate a acestui nematod. La *C. elegans*

Tabel 2. Corespondența genelor homeobox de la *D. melanogaster* cu cele de la *C. elegans*

Clase de gene homeobox la *D. melanogaster*	Corespondenți la *C. elegans*
Eve	Vab-7
AbdB	Două gene (necunoscute)
Antp	Egl-5
Scr	Lin-39
Labial	Ceh-13

nu s-a detectat clusterul *Parahox*, însă ortologul terminal care constituie un membru al acestui cluster la *Amphioxus* (cordat primitiv), se găsește dispersat la nivelul unui cromozom. Lipsesc, de asemenea, proteinele din grupul *Polycomb* (*Pc*), proteine care la *D. melanogaster* sunt implicate în supresia expresiei genelor *Hox* și în remodelarea cromatinei, intervenind în menținerea în stare inactivă a genelor (prin inducerea heterocromatinizării acestora). Mutațiile genelor *Polycomb* determină transcrierea genelor homeotice, în regiuni care în mod normal nu exprimă aceste gene. La *C. elegans*, din acest grup au fost studiate două proteine care intervin în remodelarea cromatinei: CHD4/Mi-2 și HP1.

CHD4 este un membru al familiei de proteine CHD, caracterizată prin prezența a două *chromo domenii (chromatin organization modifier)*, motiv comun proteinelor care interacționează cu cromatina. Recent, s-a demonstrat că proteina CHD4/Mi-2 este un component principal al unui complex de remodelare (NuRD=complex de remodelare a nucleozomilor), a cromatinei. Această proteină inhibă transcrierea genelor specifice inducției vulvei. Pentru a avea loc transcrierea, este necesar ca starea cromatinei să fie de așa natură, încât să permită accesul factorilor transcripționali; legarea acestei proteine la nivelul cromatinei (nu s-a demonstrat cum are loc această interacție) blochează accesul factorilor transcripționali și, deci, transcrierea genică.

Proteina HP1 aparține unei familii de proteine cu funcții înalt conservate în evoluție, care se caracterizează structural prin prezența a două domenii chromo. HP1 de la *Drosophila*, prototipul acestei familii, este localizată în heterocromatina pericentrică și joacă un rol esențial în fenomenul variegării de poziție. Proteinele omoloage de la *C. elegans*, notate HPL-1 și HPL-2 sunt ubicvitar exprimate, la nivelul tuturor tipurilor celulare, în timpul dezvoltării. Inactivarea genei *hpl-2* determină sterilitate și diferite defecte somatice.

Din clasa genelor *trithorax*, care la *Drosophila* sunt implicate în menținerea exprimării genelor homeotice în acele celule în care au fost activate inițial, la *Caenorhabditis* sunt prezente genele: *ash-1*, *ash-2*, *Trx* și *Brahma*.

In afara genelor cu funcție conservată în evoluție, la acest organism au fost identificate gene care îndeplinesc funcții noi, specifice dezvoltării sale. Genele *Apterous/ttx-3LIM* intervin în generarea circuitelor neuronale termoreglatorii, atât la *C. elegans* cât și la *D. melanogaster* și alte nevertebrate, însă la musculiță aceste gene mai au un rol, acela al diferențierii membrelor, funcție care la *Caenorhabditis* este absentă. *Caenorhabditis* nu prezintă organe vizuale, ci doar un organ sensibil la undele infraroșii; genele care la drosofilă sunt implicate în controlul dezvoltării ochilor, la *C. elegans* au o funcție diferită, modificată, controlând diferențierea acestui organ sensibil la infraroșii.

Grupul *Hox* conține șase gene, cu diferite orientări transcripționale. In funcție de aceste orientări, au fost grupate în:

1) grupul omolog anterior, reprezentat de gena *ceh-13*;

2) două grupuri mediane, omoloage cu clasa *Antp*, reprezentați de *lin-39* și *mab-5*;

3) grupul omolog posterior, reprezentat de *egl-5* și *nob-1*.

În cursul embriogenezei, genele *lin-39*, *mab-5* și *egl-5* sunt activate în diferite poziții de-a lungul axei antero-posterioare, acționând în principal în dezvoltarea post-embrionară. Funcția post-embrionară a acestor celule este legată de diferențierea post-embrionară a identității segmentelor. De exemplu, mutația genei *lin-39* face ca celulele din regiunea mijlocie a larvei să adopte destinul caracteristic al regiunilor anterioare sau posterioare.

Studii de genetică și biologia dezvoltării au arătat că în dezvoltarea axului embrionar intervin și genele *nob-1* și *php-3*; aceste gene sunt localizate una în apropierea celeilalte. Gena *nob-1* face parte dintr-un grup de complementație, *nob*. La nivelul ei au fost identificate trei mutații desemnate *ct223*, *ct351* și *ct230*. Două dintre acestea, *ct223* și *ct 351*, sunt identice fenotipic, determinând o letalitate larvară de 100% și o morfogeneză redusă până la absență, a regiunii posterioare. A treia alelă, *ct230* este întâlnită la 3% din fenotipurile Nob, indivizii purtători caracterizându-se printr-o morfologie variabilă a regiunii posterioare și o viabilitate de 97%. Animalele heteroalelice *ct230/ct223* sau *ct230/ct351* au o morfogeneză și o viabilitate intermediară.

Analizele de secvențiere a genei *nob-1* a dus la identificarea unui alt grup posterior de gene *Hox* reprezentat de gena *php-3* (*posterior Hox paralog 3*) (1 fiind *egl-5* iar 2 fiind *nob-1*), situat la o distanță de 232 pb de capătul 3' al genei *nob-1*. Acestea prezintă omologie structurală cu gena *nob-1*, având o identitate nucleotidică de 47%, la nivelul regiunii codificatoare. Mutația *loss-of-function*, la nivelul acestei gene, afectează dezvoltarea regiunii posterioare. Aceste două gene cooperează în dezvoltarea regiunii posterioare, *php-3* având un rol minor, dar necesar, în dezvoltarea normală a nematodului. Deoarece ARNm-urile transcrise de pe aceste gene prezintă la capătul 5' terminal o aceași secvență splice-lider, SL1, s-a pus întrebarea la care nu s-a dat răspuns încă, dacă aceste gene formează un operon.

Studiul amănunțit al celor șase gene *Hox* a dus la concluzia că, esențiale în dezvoltarea normală și viabilitatea organismului sunt doar genele *ceh-13* (grupul anterior) și perechea *nob-1/php-3* (grupul posterior). Din acest punct de vedere, *C. elegans* se deosebește de *Drosophila* și alte organisme cu simetrie bilaterală, a căror embriogeneză normală necesită și acțiunea unor gene din grupul median.

7. GENELE STAT LA *C. ELEGANS*

Aceste gene codifică pentru proteine semnal al transducerii și activării transcripționale. Ele au fost identificate și la *Caenorhabditis elegans* și se pare că sunt conservate în evoluție, deoarece se întâlnesc atât la eucariotele inferioare cât și la cele superioare, având rol important în dezvoltare.

Asemenea secvențe au fost denumite secvențe STAT-like și codifică pentru o proteină desemnată CE-STAT-A care este identică în proporție de 29% și prezintă o omologie de 40% cu proteina Stat 5b umană, având o aceeași organizare funcțională a domeniilor. La nivelul acestei organizări se remarcă prezența unei structuri „*coiled-coil*", necesară în interacția proteină-proteină și formarea de complexe, un domeniu SH_2 cu o secvență distinctă, un domeniu de legare la ADN și un situs de fosforilare a tirozinei.

O a doua secvență identificată ulterior, codifică pentru o proteină CE-STAT-B care are o identitate de doar 17% și o omologie de 27% cu proteina umană Stat 5b. Din punct de vedere structural, aceasta este similară proteinei STAT, de la mamifere, având aceleași domenii (de legare la ADN, domeniul SH_2 și situsul de fosforilare a tirozinei).

Proteina CE-STAT-B este un factor transcripțional care face parte din grupa factorilor transcripționali „*Zinc finger*", având o structură $C_3H_2C_3$ (C=cisteina, H=histidina).

Aceste secvențe STAT-like (genele *stat a* și *stat b*) sunt membri ai superfamiliei genice STAT, gena stat b fiind o genă degenerată.

Capitolul XLI

ANALIZA GENOMULUI UMAN: ASPECTE FUNDAMENTALE ȘI METODOLOGII

1. PROGRAMUL GENOM UMAN

Era ADN a început prin punerea în evidență a rolului său – ca vector al eredității, de către Avery, Mc Leod și Mac Carthy, în anul 1944. Prin descoperirea structurii bicatenare a ADN, de către Watson și Crick, în anul 1953, s-a marcat debutul Biologiei moleculare. Elucidarea codului genetic la mijlocul anilor '60 ai secolului XX a fost o etapă importantă, însă adevăratul apogeu se situează la începutul anilor '70 ai secolului XX, prin punerea la punct a metodelor de Inginerie genetică, care au permis o dezvoltare explozivă a cunoștințelor despre gene, funcționalitatea și reglajul lor. În câtiva ani aceste tehnici au atins un grad de sofisticare suficient pentru autorizarea studiului mai complex asupra genomurilor umane. Clonarea primei gene umane — cea a β-globinei (Rabbitts, 1976), a fost rapid urmată de multe altele, iar introducerea acestor metode in domeniul clinic a coincis cu aplicarea lor în diagnosticul bazat pe analiza ADN (Kan și Dozy, 1978). Această explozie a tehnicilor de Inginerie genetică în medicină a luat o întorsătură majoră odată cu multiplicarea posibilităților de diagnostic a maladiilor ereditare și perspectivele terapiei genice (Kahn, 1990). Simultan, eficacitatea analizei genetice crește prin utilizatea unui nou tip de „caracter" genetic, polimorfismul secvențelor la nivel ADN (Botstein și colab., 1980) și perspectiva unei hărți complete a genomului uman a devenit curând o realitate deplină în anul 2001, când s-a raportat finalizarea secvențierii grosiere a întregului genom uman.

Aceste cunoștințe se bazează pe un ansamblu de tehnici din ce în ce mai sofisticate, aplicate în elucidarea maladiilor al căror caracter ereditar este demonstrat, dar pentru care natura defectului, proteina implicată și mecanismul patologic sunt total necunoscute. Acest tip de studiu, apelează la Genetica inversată (Jordan, 1988), în care se pleacă de la defectele biochimice spre genă, ca și în cazul hemofiliei. Această metodă a câștigat un succes strălucit odată cu descoperirea genei implicată în miopatia Duchenne (Chelly, 1988) sau mai recent, descoperirea genei care este defectuoasă la persoanele cu mucoviscidoză (Goossens, 1989). Însă aceste descoperiri pun, de asemenea, în evidență unele limite generate de necesitatea realizării unui ansamblu de prelucrări extrem de fine, care implică echipe numeroase și coordonări dificile. Aceste constatări fac parte din motivațiile unor cercetători care au propus punerea în funcțiune a unui program – „HUMAN GENOME“ pentru coordonarea și sistematizarea analizei moleculare a ADN uman.

Proiectul Genomului Uman – PGU — (*Human Genome Project* — HGP) a atras atenția asupra necesității izolării genelor specifice precum și necesitatea localizării lor într-o regiune cromozomală. Scopul primar al PGU a fost acela de a secvenția genomul uman în întregime, până în anul 2005. Aceasta a implicat o cooperare internațională și este unică în domeniul biologiei. Deși ideea pentru un asemenea proiect a fost lansată încă în anul 1984, finanțarea nu a fost obținută până în anul 1988. În anul 1990 s-a format HUGO (*Human Genome Organization*) care coordonează eforturile tuturor țărilor incluse în proiect. Implicarea în proiect a fondului internațional de resurse încurajează colaborarea și liberul schimb de date. Direcțiile de acțiune și durata lor au fost bine stabilite: planul inițial de 5 ani finalizat în anul 1995, a avut ca scop construirea unei harți de lincaj, cu rezoluție înaltă și o hartă fizică bazată pe analiza bibliotecilor YAC (*yeast artificial chromosomes*) deținătoare de elemente ale genomului uman cu secvențe STS (*sequence-tagged site*) fiecare de 300 kb. Planul pentru următorii 5 ani este identificarea și localizarea genelor pentru alcătuirea unei hărți de transcripție.

Există, de asemenea, un interes în ceea ce privește rolul spacing-ului fizic în reglarea genică, organizarea elementelor repetitive și a spațiatorilor netranscriptibili, ca și distribuția transpozonilor, patologiile ADN, incluzând mutații și rearanjamente, secvențierea și caracterizarea altor modele genomice, etc. Aceste lucrări intense au condus la îmbunătățirea și progresul rapid în tehnica de secvențiere automată și în manipularea bazelor de date.

Astăzi, Programul Genom Uman, demarat în anul 1990, este o realitate: la realizarea acestuia s-au asociat Franța, Italia, Anglia, Canada și în ultimul timp Rusia, prin intermediul propriilor proiecte asupra genomului uman, precum și Japonia și China; PGU înglobează de fapt două proiecte:

- primul este centrat asupra structurii genomului uman, vizând cartografierea genelor în cromozomi;
- al doilea explică funcția tuturor genelor componente în comparație cu organismele model: *Escherichia coli, Caenorhabditis elegans, Drosophila sp.* și *Mus musculus*.

Se beneficiază de un buget important, cel puțin la acel al cercetării biologice care a început să dea rezultate: primele hărți fizice complete ale unor cromozomi precum și hărți parțiale și segmente caracteristice de ADN, fiind deja publicate.

Realizarea PGU crește dificultatea și complexitatea problemelor etice legate de avort, viață privată, confidențialitate și discriminare.

De altfel, declarația de la Inuyama (1990) sintetizează soluțiile etice în genetica umană:

- responsabilitatea cercetătorilor și terapeuților geneticieni și obligația de a se asigura că tehnicile sunt utilizate conform eticii științifice, sociale și umane;
- recomandarea doar a programelor ce au acordul pacienților și sunt concepute în beneficiul direct al acestora;
- interzicerea demarării de programe ce ar permite guvernelor sau organizațiilor private de a abuza tehnic;
- recomandarea dialogului multidisciplinar și transcultural în delimitarea și asigurarea cadrului și criteriilor etice.

Indiscutabil, în anii următori, problema bioetică se va amplifica și se va diversifica din ce în ce mai mult, impunând crearea și buna funcționare a Comitetelor de bioetică multidisciplinară, care să redacteze în continuare ghiduri pentru pacienți și cercetători științifici și să ofere consultanța forurilor abilitate pentru completarea dinamică a cadrului legislativ în funcție de problemele nou apărute.

2. PARTICULARITĂȚILE GENOMULUI UMAN

Aproximativ 99% din ADN celular nu este transcris în proteine. Deci, numai o parte din totalul ADN intervine direct în sinteza proteinelor enzimatice și neenzimatice. Acest ADN constituie genele.

ADN necodificator este format dintr-un număr variabil de scevențe repetate de nucleotide. ADN satelit cuprinde secvențe scurte, de 5–10 nucleotide, înalt repetate. Există secvențe moderat repetate de 100–1000 de ori. Asemenea secvențe, numite încă intermediare, sunt distribuite în toți cromozomii. Ele nu au o structură identică ci similară. Cele mai importante secvențe intermediare sunt scevențe ALU, numite astfel deoarece sunt recunoscute de endonucleaza *Alu*. Există un milion de astfel de secvențe, fiecare dintre ele fiind formată din aproximativ 300 de perechi de baze. La fiecare extremitate, secvențele ALU au 5–10 perechi de baze care sunt dispuse succesiv de-a lungul cromozomului. Există apoi secvențele unice care reprezintă genele. După toate probabilitațile, există o relație directă între lungimea unui cromozom și numărul de gene pe care îl include.

PARTICULARITĂȚI:

- subunitățile proteinelor heteromerice sunt condiționate de gene situate în cromozomi diferiți — este „o măsură de precauție";
- genele implicate în etapele succesive ale unui proces metabolic sunt situate în cromozomi diferiți — fac excepție enzimele multifuncționale care participă la realizarea aceluiași produs final — este facilitată astfel reglarea coordonată;
- în genomul uman există pseudogene — gene cu o structură similară cu cea a genelor structurale, dar care în urma unor mutații au devenit inactive. Ele par să fie rezultatul unei duplicații sau, mai probabil, al integrării transcriptului pre-ARNm, deoarece au introni. Ele pot fi situate aproape de genele normale, ca în cazul genelor globinice α și β, sau îndepărtate, cum sunt pseudogenele pseudoargininei succinat sintetazei.

Uneori se face o distincție între pseudogenele rezultate dintr-o recombinare inegală și pseudogenele rezultate din copierea unor secevențe ARN în ADN — ultimele se numesc retropozoni. Sub acest nume sunt incluse însă și secvențele scurte sau mai lungi dispersate în genomul uman (până la 500 000 copii în genom).

Retropozonii au frecvent acțiune mutagenă. Dar se pare că prin mutații succesive pot deveni un factor evolutiv, constituind o rezervă de variabilitate genică.

- Genele contigui explică o parte dintre sindroamele plurimalformative. Există numeroase sindroame caracterizate prin anomalii care pot fi atribuite unei singure mutații, cu alte cuvinte, care nu sunt pleiotropice. Aceste sindroame au o importantă contribuție la variabilitatea individuală și familială. De exemplu, sindromul WAGR asociază o tumoră Wilms, aniridie, malformații genito-urinare și retardare mentală. Mutația se află pe brațele scurte ale cromozomului 11 (11p13). Analiza mutației a demonstrat că, de fapt, în ea este implicată o regiune care cuprinde mai multe gene, o genă pentru aniridie, o altă genă pentru tumora Wilms și alta pentru sinteza unei proteine — rhombotina, prezentă în rhombotinoame, care este modificată în unele leucemii acute cu celule T.
- O genă poate fi amplificată, uneori de sute de ori, ca singurul mijloc de apărare al organismului în fața unei agresiuni exterioare.
- Unele gene se exprimă doar în cursul diferențierii embrionare, altele se exprimă de-a lungul întregii ontogeneze și se numesc gene de întreținere (*house-keeping genes*). Aceste gene prezintă câteva particularități funcționale — funcționează practic permanent, și structurale — nu au cutia TATA și au numeroase secevențe CG hipometilate. Ele asigură sinteza enzimelor glicolizei și ale metabolismului intermediar. Cu toate acestea, uneori, genele de întreținere au o cutie TATA.

Genomul uman este reprezentat de 23 perechi de cromozomi împarțiți în 7 grupe morfologice, notate în ordinea mărimii, cu litere mari ale alfabetului (Fig.1):

- grupa A – cuprinde perechile de cromozomi de dimensiune mare, 1–3: perechile 1 și 3 sunt constituite din cromozomi metacentrici, pe când, perechea 2 cuprinde cromozomi submetacentrici;
- grupa B — perecile 4 și 5 cu cromozomi submetacentrici mari;
- grupa C — perecile de cromozomi 6, 7, 8, 11, cu cromozomi metacentrici, perechile 9, 10, 12 cu cromozomi submetacentrici de dimensiune mijlocie;
- grupa D — perechile 13–15 cu cromozomi acrocentrici, de dimensiune mijlocie și cu sateliți;

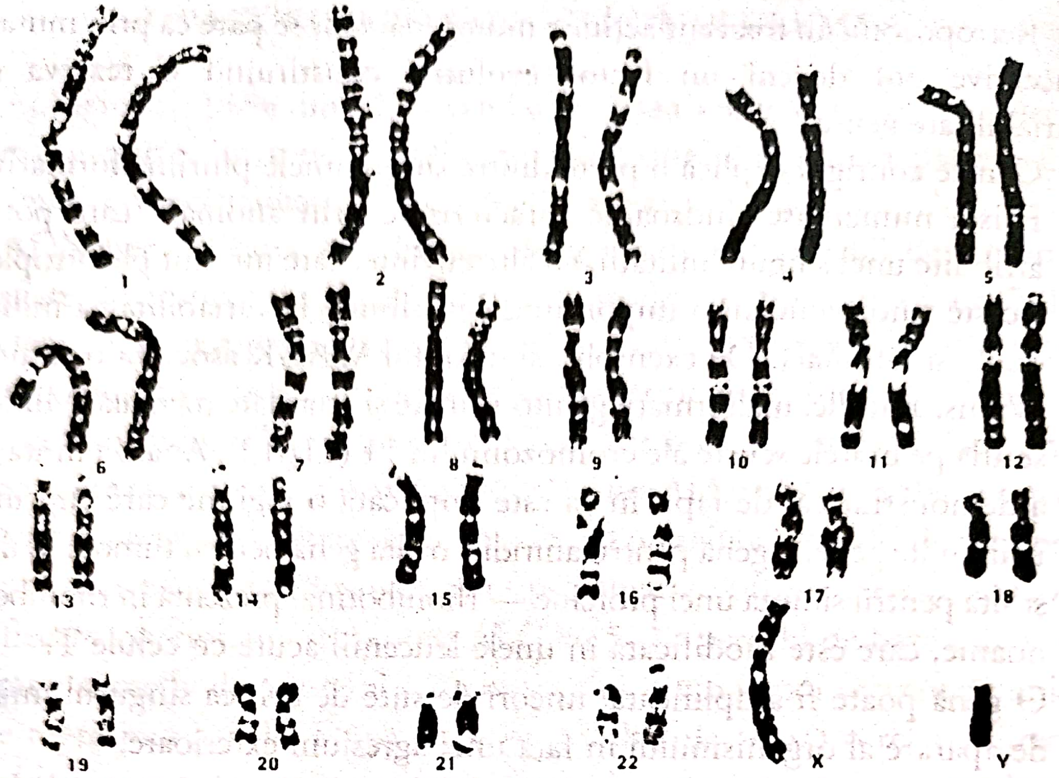


Fig. 1 — Cariotip uman normal, bandat G, 46, XY
(GENECARE MEDICAL GENETICS CENTER, CHAPEL HILL, NC)

- grupa E — perechea de cromozomi 16 este metacentrică, iar perechile 17 și 18 – submetacentrici, de dimensiune mică;
- grupa F — perechile de cromozomi 19–20 — cromozomi metacentrici mici;
- grupa G — perechile de cromozomi 21–22 — cei mai mici cromozomi ai complementului cromozomal, sunt acrocentrici și cu sateliți;
- cromozomul X este similar cromozomilor din grupa C și este metacentric;
- cromozomul Y – este un acrocentric mic, apropiat ca mărime cu cei din grupa G.

3. ORIGINEA ȘI EVOLUȚIA GENOMULUI UMAN

Complementul cromozomal uman, ca și oricare alt component la om, este un produs al unui proces transmutațional care a avut loc la diferite stadii ale dezvoltării mamiferelor. Dacă privim evoluția ca pe un eveniment continuu, unde schimbarea poate fi treptată sau bruscă, ea poate apare la diferite trepte/grade ale presiunilor adaptative sau poate fi un curent randomic neselectiv. Pentru explicarea diversității cariotipice existente sunt propuse căile de cercetare ale filogeniei cromozomale.

După cele mai multe date de genetică modernă, remanierile cromozomale reprezentate prin translocații, duplicații și inversii au constituit cei mai importanți factori ai inițierii procesului speciației, deoarece ei pot condiționa realizarea izolării reproductive a indivizilor la care au apărut asemenea rearanjamente cromozomale de restul populației.

Specia umană a evoluat paralel cu maimuțele antropoide, prin mecanisme genetice de duplicație, inversie, translocație, etc. Există asemănări frapante a căror amploare este dată de faptul că 99% din aminoacizi sunt identici în polipeptidele omului și ale cimpanzeului. Hibridizarea ADN uman cu ADN de cimpanzeu relevă o deosebire extrem de mică, de numai 1,1%. Distanța filogenetică dintre om și cimpanzeu este doar de 25–50 de ori mai mare decât aceea dintre diferitele rase umane.

Interesantă este originea și evoluția speciei umane, având la bază remanieri cromozomale de tipul translocației robertsoniene (fuziune centrică). Maimuțele actuale cele mai apropiate omului, încadrate în familia *Pongidae* (cimpanzeul, gorila și orangutanul) au 48 de cromozomi, pe când specia umană *Homo sapiens* are 46 de cromozomi. Deducția este logică: din strămoșul comun al maimuțelor antropomorfe și al omului a derivat specia umană în urma unei translocații reprezentate de fuziunea a doi cromozomi, apărută acum circa 10–15 milioane de ani. Această remaniere cromozomală a generat un ritm extrem de rapid al evoluției care a făcut ca în circa 1–2 milioane de generații să se contureze specia umană cu atributele sale actuale. Sensul evolutiv cel mai caracteristic a fost poziția erectă, mersul biped și mai ales creșterea volumului creierului (cerebralizarea). Astfel, în ultimile 300 mii de generații, adică din momentul apariției australopitecilor, volumul craniului s-a triplat.

Cariotipurile acestor specii sunt similare, dar nu identice; s-a arătat că ar fi putut deriva de la o altă specie, cu rearanjamente cromozomale presumtive. Studiile comparative au arătat că cel mai frecvent tip de aranjament presumtiv din acest grup este inversia pericentrică. Alt tip de rearanjament, mai puțin frecvent, s-a presupus a fi o fuziune a acrocentricilor neomologi (cazul cromozomului 2 uman)(Fig.2).

Cariotipul uman prezintă frapante similitudini cu acela al cimpanzeului. Prima pereche de cromozomi este identică la om și la cimpanzeu. Perechea a 2–a de cromozomi umani a apărut în urma unei fuziuni centrice dintre cromozomii acrocentrici, care au rămas ca atare la cimpanzeu. Perechea a 3–a este identică la cimpanzeu și la om. În perechea a 4–a și a 5–a de cromozomi, la om a apărut o inversie pericentrică. Tot inversie pericentrică au suferit și cromozomii umani din perechile 12, 17 și 18, iar cromozomul 9 a suferit, pe lângă o inversie pericentrică, și o mică deleție. Cromozomii din perechile 7, 8, 10 și 11 sunt aparent similari la cimpanzeu și la om.

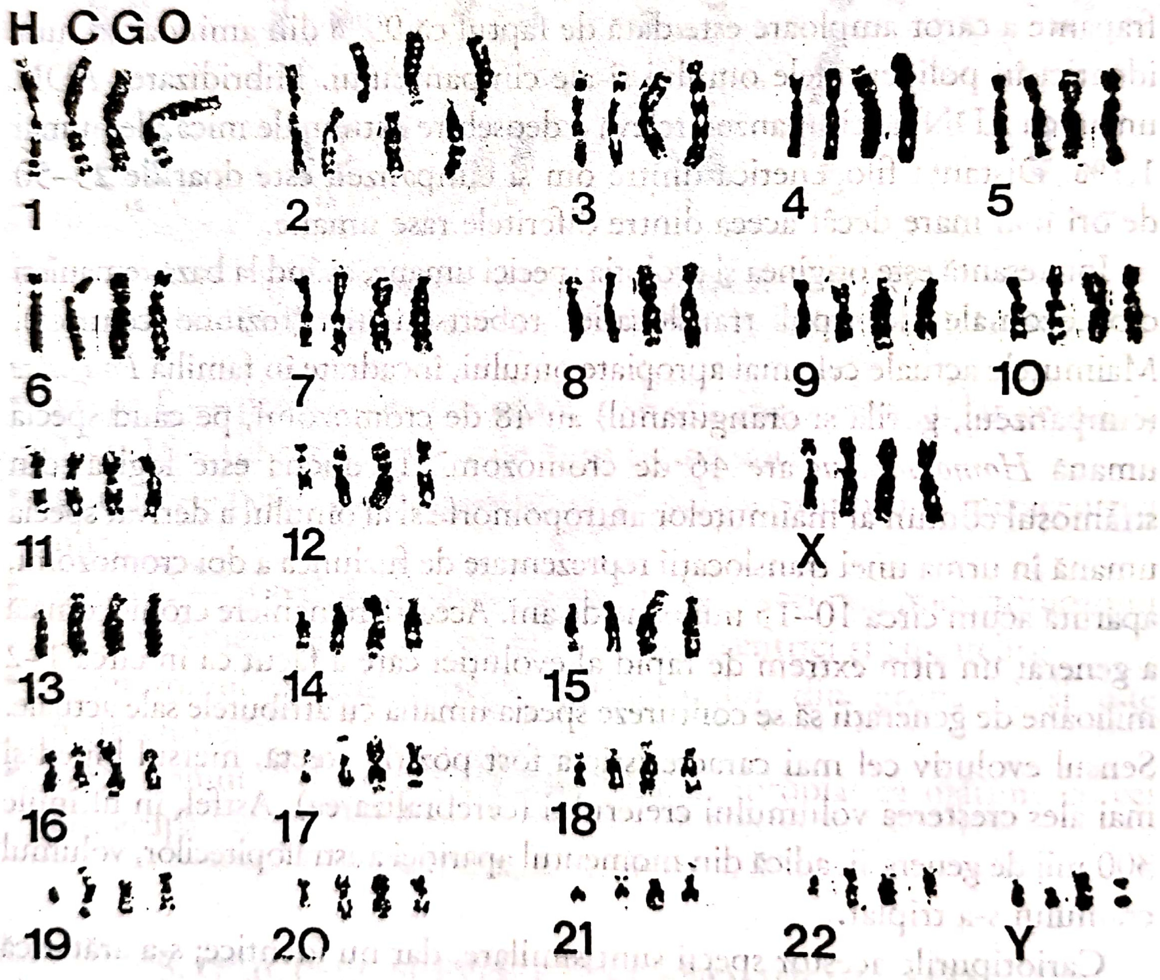


Fig. 2 — Modelul de bandare G al cromozomilor la om (H), cimpanzeu (C), gorilă (G) și orangutan (O) (H.N.SEUANEZ, Cytogenetics, 1987)

Cromozomii din perechile 6, 9, 21 ca și cromozomul X au rămas neschimbați la maimuțele antropomorfe și la om. Cromozomul X se pare că a fost cel mai conservativ, el rămânând neschimbat de-a lungul întregii evoluții a pongidelor și a omului și, datorită acesut fapt, el poartă aceleași gene la aceste specii diferite.

Genele pentru ARNr la om sunt localizate în regiunile organizator nucleolare ale cromozomilor 13, 14, 15, 21 și 22. Și la cimpanzeu există tot 5 cromozomi organizatori nucleolari, dar ei sunt cromozomi 14, 15, 17, 22 și 23. Având în vedere remanierile cromozomale survenite, am putea considera ca, de fapt, localizarea genelor pentru ARNr a rămas aceeași la cimpanzeu și la om.

Translocația (fuziunea centrică) pentru a se fixa, a implicat incestul: unicul cuplu cu 47 de cromozomi a dat o descendență segregantă cu 47, 48 și 46 de cromozomi. Aceasta din urmă s-a dovedit mai avantajată în lupta pentru existență, impunându-se pe arena evoluției și constituindu-se în specia umană; formele intermediare fiind eliminate ca experiențe nereușite ale evoluției.

Marea majoritate a acestor rearanjamente au avut ca rezultat o considerabilă schimbare a complementului cromozomal al strămoșului nostru comun, producând relocări semnificative ale materialului eucromatinic. Se crede că acest complement cromozomal al strămoșului comun ar fi fost mai flexibil și, prin urmare, mai tolerant la asemenea rearanjamente, decât ar fi complementul cromozomal al omului modern.

Similitudinile cromozomale între om și maimuțele mari (*great apes*), la nivel morfologic, este în general, confirmat prin cartare genică comparativă. Această concordanță este valabilă numai pentru omologii sintenici ai genelor *structurale*, dar nu și pentru secvențele moderat repetitive, cum ar fi ADN ribozomal, sau pentru secvențele înalt repetitive. Evoluția acestor secvențe repetitive pare a fi independentă de filogenia cromozomilor la primate, fără deosebire de similitudinile morfologice care pot persista între specii. Brațul omolog al cromozomului 2 de la om nu coincide cu cel de la maimuțe; 2p uman conține loci care sunt localizați în omologul 2q la alte specii și vice-versa. În plus, omologul 20 uman (cromozomul 20) la maimuțele mari nu conține locusul inozintrifosfatazei (ITPA), în ciuda similitudinilor morfologice evidente între acest cromozom uman și cel de la maimuțele mari. De fapt, locusul ITPA, la maimuțele mari, a fost considerat a fi sintenic cu locusul pentru nucleozidfosforilaza (NP) care la om este localizat pe cromozomul 14. O transpoziție genică punctiformă, încă neconstatată la nivel citologic, a fost responsabilă pentru apariția unei noi asocieri sintetice la cimpanzeu și gorilă, similar cu cel uman 14+20. Pe când la cimpanzeu acești loci sunt asociați la cromozomul 15 (omolog morfologic al cromozomului 14, la om) și sunt localizați pe cromozomul 18, la gorilă (similitudini morfologice între cromozomul 14 uman și cromozomul 18 de la gorilă — foarte puțin evidente). Analizându-se cromozomii bandați cu înaltă rezoluție, s-a evidențiat o translocație reciprocă prezumtivă, sugerând că gorila are 2 perechi de cromozomi, una similară cu 5q-17q uman și alta 5p-17p uman. Deși modelul de bandare cromozomală poate da un suport parțial la acest rearanjament presupus, distribuția genică comparativă a locusului timidinkinazei (TK) a exclus posibilitatea ca un astfel de rearanjament să fi apărut mereu.

Comparațiile cariologice și distribuția genică comparativă a demonstrat clar o conservare evolutivă remarcabilă, la nivel morfologic și sintenic între mamifere. Aceste studii au permis să se stabilească filogenia diferitor cromozomi umani și asocierile de linkage.

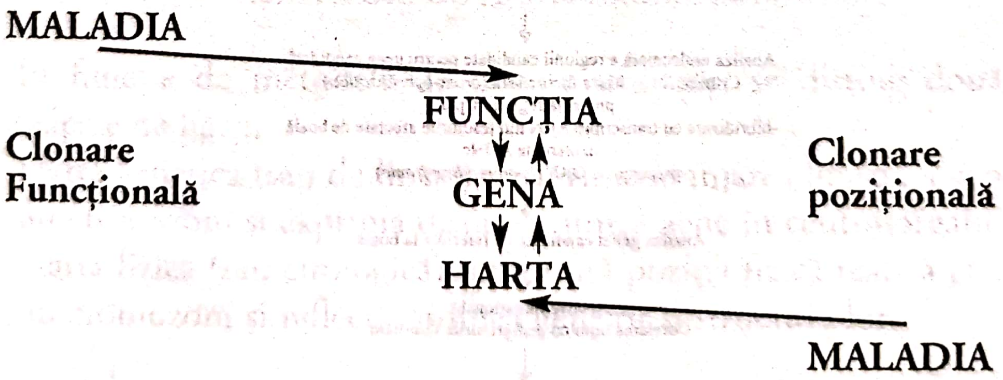
1. Complementul cromozomal la mamifere a fost drastic schimbat în decursul evoluției de când această clasă a apărut pe pământ. Rearanjamentele cromozomale au apărut la diferite rate în fiecare ordin de mamifere; un exemplu extrem al cariotipurilor înalt rearanjate poate fi identificat printre rozătoare, în timp ce alte ordine, precum Primatele, sunt mai conservate. Totuși, ratele schimburilor cromozomale sunt variabile în interiorul ordinelor; la maimutele mici și maimutele de noapte s-au constatat rate înalte ale rearanjamentelor cromozomale, în contrast cu alte grupe asemănătoare cu maimutele mari și om. Un caz extrem de conservare cromozomală, precum la Rhesus — babuin, se arată că speciația se putea produce în absența rearanjamentului cromozomal, deoarece evoluția organismică și cea cromozomală sunt absolut separate.
2. Este o coincidență generală între însușirile morfologice ale cromozomilor și conținutul lor genic în ordinul primatelor. Deși se crede că cromozomii omologi conțin asocieri de linkage similare când sunt comparate două sau mai multe specii, cu toate că au fost raportate și excepții. Aplicată la genele structurale, nu însă și la secvențe repetitive (ADNr și ADN satelit) se apreciază că evoluția pare a fi independentă de schimbul cromozomal.

3. În absența similitudinilor cariotipice aparente ca dintre om și șoarece, compararea genică este iluminată prin prezentarea regiunilor locilor omologi continui care au fost menținuți intacți in genomul mamiferelor. Extraordinara asemănare intre om și alte mamifere, ca distribuție a genelor, sugerează clar că asocierea mai multor loci este posibilă a fi adaptativă.
4. O analiză detaliată a cromozomilor și asocierile linkage arată că principiul economiei poate fi universal acceptat pentru urmărirea căilor de evoluție. Se evidențiază clar că unele tipuri specifice de rearanjamente cromozomale par a fi mai frecvente decât s-ar aștepta pentru evenimente randomice.

4. CARTAREA GENICĂ

4.1. STRATEGII DE CARTARE

Strategiile de cartare reprezintă metode prin care secvențele genice pot fi dispuse într-o regiune cromozomală specifică, ceea ce are relevanță atunci când genele sunt implicate în determinarea unei anumite condiții patologice sau se urmărește înțelegerea schimburilor mutaționale. Se întamplă foarte rar ca o secvență genică să poată fi izolată direct; întregul proces fiind o interacție de studii genetice și moleculare, incluzând o investigare complexă. Există două strategii principale pentru definirea și clonarea locilor responsabili pentru maladie.



1. **Clonarea funcțională.** Această tehnică este utilizată atunci când se cunoaște defectul biochimic de bază al unei boli. Se realizează purificarea proteinei implicate și determinarea secvenței de aminoacizi. Această

secvență poate fi, de asemenea, utilizată la determinarea compoziției în nucleotide a ARN/ADN și, ulterior, în clonarea genei. Pentru marea majoritate a genelor, această informație nu există, deci, în general, este utilizată cea de a doua strategie.

2. **Clonarea pozițională.** Aceasta abordare este cunoscută ca genetică inversată (*reverse genetics*). Analiza pedigre-ului, adică screening-ul familiilor afectate, este realizată folosind markeri polimorfici de ADN pentru stabilirea *linkage*-ului între maladie și o anume regiune de ADN. Îndată ce lincajul a fost în mare masură stabilit, aria afectată poate fi restrânsă, folosind markeri mult mai detaliați, și poate fi examinată la nivel molecular pentru secvența genei candidate (Fig.3).

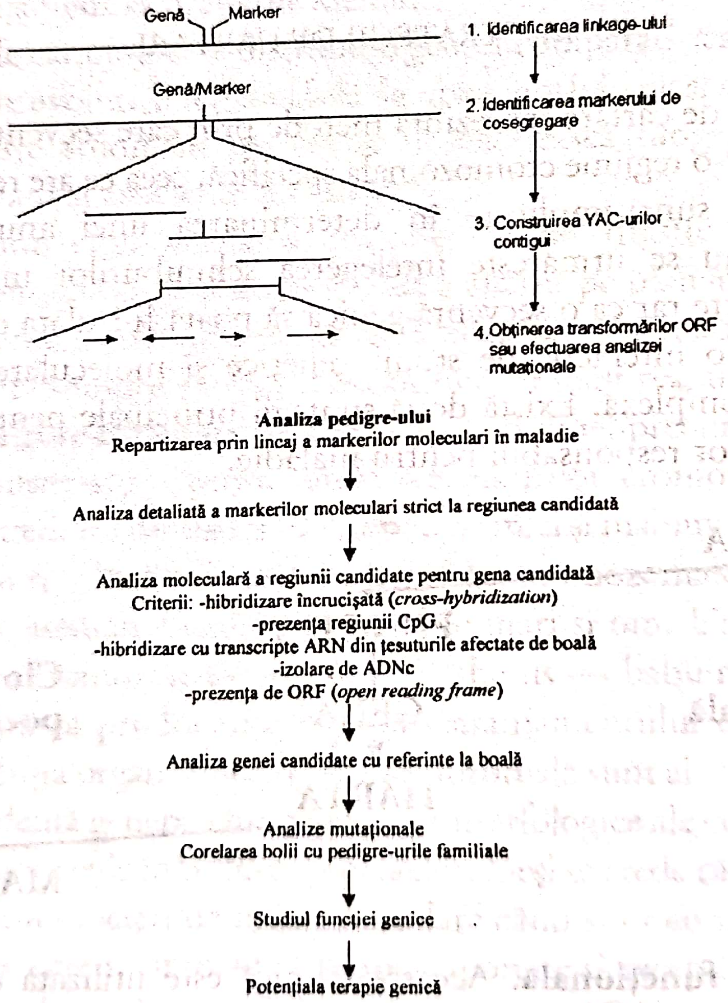

Genă
Marker
1. Identificarea linkage-ului
Genă/Marker
2. Identificarea markerului de cosegregare
3. Construirea YAC-urilor contigui
4.Obţinerea transformărilor ORF sau efectuarea analizei mutaţionale
Analiza pedigre-ului
Repartizarea prin lincaj a markerilor moleculari în maladie
Analiza detaliată a markerilor moleculari strict la regiunea candidată
Analiza moleculară a regiunii candidate pentru gena candidată
Criterii: -hibridizare încrucișată (cross-hybridization)
-prezența regiunii CpG
-hibridizare cu transcripte ARN din ţesuturile afectate de boală
-izolare de ADNc
-prezenţa de ORF (open reading frame)
Analiza genei candidate cu referinte la boală
Analize mutaţionale
Corelarea bolii cu pedigre-urile familiale
Studiul funcţiei genice
Potenţiala terapie genică

Fig. 3 — Schema strategiilor clonării poziționale.

4.2. NOȚIUNI DE CARTARE GENICĂ

Analiza genomului uman pentru cunoașterea determinanților genetici ai diverselor caracteristici cu impact clinic, precum și înțelegerea modului cum au evoluat, constituie unul din scopurile dificil de atins ale geneticii. Primul obiectiv din analiza oricărui genom este reprezentat de cunoașterea distribuției genelor pe fiecare cromozom și apoi, ordinea în care sunt așezate aceste gene în cromozomi și distanța dintre ele. Aflarea poziției în cromozomi a diferitor loci este urmată de indicarea acestora sub forma unor reprezentări grafice liniare denumite hărți cromozomale. Fiecare cromozom își are harta sa genică. Întocmirea hărților cromozomale constituie procesul de cartare sau cartografiere genică.

Dezvoltarea și aplicarea unui arsenal de tehnologii moleculare din ce în ce mai bogat a produs la om hărți genice complexe.

Într-o prima etapă, este necesară realizarea unui schelet al hărții prin acoperirea genomului cu markeri polimorfici situați la intervale regulate. Markerii reprezintă puncte de reper cu poziție bine stabilită pe cromozomi, ei asigurând împărțirea cromozomilor în fragmente bine și precis delimitate.

Urmează etapa a doua, în care acest schelet este utilizat pentru a obține o hartă de rezoluție mai mare.

Apoi, a treia etapă care constă în secvențierea nucleotidică a genelor.

4.2.1. TIPURI DE HĂRȚI CROMOZOMALE

În funcție de metodele de cartare utilizate, se disting două tipuri principale de hărți:

- Harta genetică (sau de lincaj) reprezintă aranjarea lineară a genelor pe un cromozom și exprimă distanța dintre gene în centimorgani
- Harta fizică (sau citologică) reprezintă poziția fizică reală a genelor pe un cromozom și reflectă ordinea genelor și structura lor.

CAPITOLUL XLII

GENOMUL UMAN ÎN PATOLOGIE

Dezvoltarea rapidă a geneticii și aplicarea ei în studiul patologiei umane a impus cunoașterea principiilor de genetică medicală ca o mare necesitate în acțiunile de diagnostic, tratament și mai ales de profilaxie a bolilor. Patologia genetică are o pondere importantă prin numărul de afecțiuni și frecvența lor.

Modificările cantitative sau calitative ale informației conținute în materialul genetic al celulelor, determină apariția mutațiilor. Mutațiile la nivel cromozomal sunt reprezentate atât de modificările structurale ale cromozomilor, cât și de modificările numerice. Modificările structurale constau în schimbarea conținutului genetic al cromozomilor sau în schimbarea poziției unor grupe de gene de pe un cromozom pe un altul, iar modificările numerice duc la abateri în plus sau în minus de la numărul normal diploid de cromozomi.

1. MODIFICĂRI CROMOZOMALE NUMERICE

Modificările numerice sunt abateri de la numărul normal diploid de cromozomi. Aceste abateri sunt consecința unei non-disjuncții în timpul diviziunii celulare.

1.1. ANEUPLOIDII CROMOZOMALE HETEROZOMALE

Anomaliile numerice ale cromozomilor de sex (heterozomi sau gonozomi) sunt relativ frecvente și cauzează defecte severe la indivizii afectați.

- *Sindromul Klinefelter* (47,XXY). Analizele cromozomale au evidențiat în cadrul sindromului numeroase variante citogenetice. Dintre acestea cea mai frecventă este 47,XXY — 80%. Indivizii cu mozaic 47,XXY/46,XY — 10%, prezintă un fenotip asemănător cu cei cu cariotip 47,XXY, atunci când este mai mare frecvența celulelor trisomice. Indivizii cu cariotip 48,XXXY apar cu o frecvență mai mică decât cele două constituții genetice menționate. Varianta 49,XXXXY prezintă, în general, aceleași aspecte clinice, remarcându-se retardare mentală pronunțată. Indivizii cu constituția genetică 50,XXXXXY prezintă aspecte clinice ale sindromului Klinefelter, remarcându-se multiple anomalii congenitale.

- *Sindromul Turner* (45,X). Femeile cu acest sindrom prezintă anomalii de dezvoltare sexuală, somatică, tulburări metabolice și psihice. În acest caz, se remarcă mozaicuri 46,XX / 45,X și 46,XX / 47,XXX / 45,X.

În ultimul timp, la pacienții cu sindrom Turner se citează identificarea cariotipurilor 45,X / 46,X+marker sau 46,X+marker. S-a estimat că femeile cu fenotip Turner sau intersexualii cu un cromozom Y anormal și cu disgeneză gonadică, prezintă un risc de 20% pentru dezvoltarea gonadoblastomului. Astfel, este foarte important să se cunoască dacă pacienții cu sindrom Turner au sau nu un cromozom Y anormal. S-a studiat compoziția cromozomală la acești pacienți cu sindrom Turner, folosind tehnica PCR. S-au identificat 9 loci ai cromozomului Y, incluzând: 4 loci pe brațul scurt (dintre care — SRY), un locus la centromer și 4 loci pe brațul lung. Aceștia sunt amplificați pentru a determina originea cromozomilor marker. O metodă rapidă de înaltă sensibilitate și fără izotopi radioactivi, pentru detectarea cromozomilor Y anormali la pacienții cu sindrom Turner s-a stabilit a fi hibridizarea cromozomală *in situ*.

- *Sindromul Triplo X* (47,XXX). În general, aspectele fenotipice ale acestor femei nu se deosebesc de ale celor normale. În cadrul populației de nou-născuți, incidența trisomiei se apreciază ca fiind în jur de 1,2%. S-a remarcat o predispoziție a acestor femei pentru neoplasme (2,2%) și o incidență crescută (2,6–6,7%) pentru femeile cu probleme psihice.

- *Tetrasomia X* (48,XXXX). Femeile cu acest cariotip nu prezintă aspecte clinice specifice. În cele mai multe cazuri, modificarea cromozomală este asociată cu retardare mentală.
- *Pentasomia X* (49,XXXXX). Reprezintă o constituție cromozomală foarte rară. Femeile cu acest cariotip prezintă unele aspecte fenotipice caracteristice sindroamelor Down și Turner.
- *Sindromul bărbaților cu cariotip 47,XYY.* Întrucât acești bărbați au fost semnalați cu o incidență crescută printre deținuți, s-a făcut afirmația că un cromozom Y supranumerar conduce la o tulburare a personalității cu comportament antisocial. Nu s-au semnalat anomalii somatice care să fie asociate cu prezența unui cromozom Y suplimentar. Incidența indivizilor cu cariotip 47,XYY stabilită pe loturi de nou-nascuți este cuprinsă între 0,03–0,37%.
- *Bărbați cu cariotip 46,XX.* Pe baza datelor acumulate s-au conturat trei ipoteze care se referă la elucidarea mecanismelor prin care sunt induse dezvoltări ale testiculelor la barbații cu cariotip XX:

I — existența unui cromozom Y într-un număr redus de celule sau care a existat anterior și apoi a fost eliminat;

II — o translocație reciprocă între brațul scurt al cromozomului X și brațul scurt al cromozomului Y, în cursul spermatogenezei, conduce la un transfer de material genetic din cromozomul Y în cromozomul X;

III — dezvoltarea testiculelor și a fenotipului masculin la indivizii XX se datorează, probabil, unei gene rare, autozomal recesive, cu efect masculinizant. Etiologia bărbaților cu cariotip 46,XX este, așa dar, heterogenă.

- *Femei cu cariotip 46,XY* — sindromul testiculului feminizant. Acest sindrom asociază: gonade — testicule, fenotip — feminin, cariotip — XY.

Embrionul urma să se masculinizeze. El are gonade masculine normale, structural și funcțional. Secretă cantități adecvate de testosteron. Celulele țintă nu răspund însă și organismul se feminizează pasiv. Organele genitale externe sunt feminine, dar vaginul este scurt și orb, uterul și trompa sunt absente. Sunt prezente testicule fie în abdomen, fie în canalele inghinale. În ambele forme există o creștere a nivelului testosteronului și LH-ului.

Insensibilitatea la androgeni este expresia unor mutații care reduc numărul și calitatea receptorilor pentru androgeni. Au fost izolate două forme de receptori: A și B codificați de o genă situată pe cromozomul X — Xq11–q12, de peste 90 kb.

La nivel genic, au fost identificate mai multe mutații, aproape toate substituții; foarte rar deleții. Ele antrenează blocarea sintezei receptorilor, sinteza unei proteine mai scurte care nu se mai leagă cu ADN sau care are o capacitate de legare redusă. În absența receptorilor nu mai are loc activarea genelor specifice. Aceeași receptori ar putea interveni în transcripția, maturarea și transportul ARNm.

Aproximativ 15% dintre femeile XY își datorează intersexualitatea unei mutații a genei pentru diferențierea testiculelor SRY. În urma unor mutații, proteina sintetizată nu mai are capacitatea de a se lega de ADN. Cele mai multe mutații sunt de novo și sunt mutații punctiforme.

1.2. ANEUPLOIDII CROMOZOMALE AUTOZOMALE

- *Trisomia 21 = sindromul Down* (47,XY+21 sau 47,XX+21). Acest sindrom prezintă răspândirea cea mai largă dintre toate aneuploidiile cromozomale. Apariția sindromului Down este semnificativ asociată cu vârsta înaintată a mamei și cu expunerea la radiații. În general, în trisomiile autozomale, originea cromozomilor supranumerari a fost pusă pe seama non-disjuncției cromozomilor din ovogeneză, întrucât vârsta mamei este asociată cu aceste anomalii. Se apreciază că în jur de 4,8% dintre persoanele cu sindrom Down au la origine o translocație D/G sau G/C, cu o incidență crescută (58,5%) a cromozomului 14 — t(14;21). La indivizii cu mozaic 46,XX/47,XX+21, se pare ca amploarea modificărilor somatice este corelată cu frecvența celulelor trisomice. Pacienții prezintă deficiență mentală severă, anomalii strucrurale ale creierului, microcefalie.
- *Trisomia 13 = sindromul Patau* (47,XY+13 sau 47,XX+13). Acest sindrom determină moartea indivizilor purtători, datorită non-disjuncției, în câteva ore sau săptămâni după naștere. Se remarcă deficiența mentală severă, anomalii craniene, etc.
- *Trisomia 18 = sindromul Edward* (47,XY+18 sau 47,XX+18). Acest sindom determină moartea indivizilor după câteva săptămâni sau luni de la naștere, dar ocazional pot depași câțiva ani. Cazurile de supraviețuire

prelungită prezintă mozaicuri cromozomale, ceea ce denotă faptul că non-disjuncția mitotică a avut loc în a doua sau în următoarele diviziuni de clivaj.

Pentru determinarea aberațiilor cromozomale induse *in vitro*, tehnica FISH cu probe specifice de ADN cromozomal este utilizată din ce în ce mai mult. Este o tehnică foarte avantajoasă pentru studiile aneuploidiilor. Frecvențele nucleilor limfatici, conținand 3–4 copii cromozomale, sunt comparate cu valorile metafazice obținute din studii populaționale umane și valorile interfazice, obținute din studii similare, folosind tehnnica FISH multicolor.

Tehnica FISH multicolor a fost folosită în depistarea aneuploidiilor din sperma umana în vederea „testării" teoriilor non-disjuncției.

Deși este cunoscut faptul că toți cromozomii sunt susceptibili să sufere non-disjuncție meiotică, totuși, nu este clar dacă toți cromozomii prezintă aceeași frecvență a non-disjuncției. Prin utilizarea tehnicii FISH multicolor și a probelor specifice cromozomale s-a determinat frecvența disomiilor în sperma umană pentru cromozomii 1, 2, 4, 9, 12, 15, 16, 18, 20, 21 și pentru cromozomii de sex.

Frecvențele medii ale anomaliilor au fost: 0,09% pentru cromozomul 1; 0,08% — 2; 0,11% — 4; 0,14% — 9; 0,16% — 12; 0,11% — 15,16,18; 0,12% — 20; 0,29% — 21; 0,43% — pentru cromozomii de sex.

Prin compararea frecvențelor medii pentru disomie s-a constatat ca pentru cromozomii de sex și cromozomul 21 sunt frecvențe semnificativ mai mari de disomie, decât în orice alte studii obținute pe autozomi. Datele corelate cu totalitatea datelor obținute prin cariotiparea celulelor din sperma umană sugerează că bivalentul cromozomului de sex și bivalentul cromozomului 21 sunt mai susceptibili la non-disjuncție în timpul spermatogenezei.

1.3. POLIPLOIDII

Poliploidiile se remarcă prin prezența seturilor haploide suplimentare de cromozomi, față de numărul diploid normal.

- *Triploidia* (3n=69), observată frecvent la embrionii avortați, reprezintă o condiție letală. Zigoții triploizi pot lua naștere fie prin fecundarea unui ovul de către doi spermatozoizi, fie prin fuzionarea unui ovul cu un globul polar și fecundarea are loc cu un spermatozoid, fie în urma nondisjuncției în cea de a doua diviziune meiotică, în gametogeneza femelă sau masculă.

- *Tetraploidia* (4n=92) este extrem de rară și totdeauna letală, poate fi consecința fuzionării a doi gameți anormali nereduși (2n+2n), dar și consecința unei supresii a primei diviziuni de clivare a unui zigot diploid, după replicarea cromozomilor și separarea anafazică, însă, înainte de diviziunea citoplasmei.

Poliploidizarea poate apare și în decursul vieții adulte, datorită unor accidente mitotice. Celulele poliploide au fost evidențiate în populații reduse în maduva osoasă și în culturi de limfocite, fiind însă deosebit de frecvente în tumori și în unele tipuri de leucemii.

În prezent, pentru detectarea hiperploidiilor și poliploidiilor se folosește tehnica FISH, care reflectă fidel datele obținute din analiza metafazică. Totuși, datorită nepotrivirii analizelor interfazice pentru depistarea hiperploidiilor de poliploidii, estimarea frecvenței nucleilor aneuploizi printr-un marcaj unic în FISH poate fi considerată doar o aproximație a frecvențelor absolute. Pentru o apreciere mai mare se efectuează FISH multicolor cu cel puțin două sau mai multe probe.

2. MODIFICĂRI CROMOZOMALE STRUCTURALE

În urma acțiunii unor agenți mutageni, în timpul vieții intrauterine sau în decursul vieții adulte, pot să apară diferite modificări ale cromozomilor.

Deleția sau monosomia parțială (pierderea unui segment cromozomal intercalar sau terminal).

Cel mai răspândit caz în acest sens este — *deleția terminală 5p⁻* sau monosomia parțială a brațului p al cromozomului 5 = *sindromul „cri du chat“*. Caracteristic — plansul specific al copiilor afectați. Incidența este de 1:50.000 în populația de nou-nascuți.

- *Deleția interstițială 11p⁻* — este asociată cu tumora Wilms.
- *Deletia 2p⁻* este prezentată în literatura de specialitate la unul din trei copii ai unei mame cu t(2;8)(p16–q24.3). Acesta este un raport clinic și citogenetic a unui caz rar al deleției terminale a brațului scurt al cromozomului 2. Deleția este rezultatul segregării neechilibrate a

translocației materne. Astfel, este conturat fenotipul și este dată o descriere clinică a unui băiat de 15 ani, retardat mental, ce prezintă deleția partială a brațului scurt al cromozomului 2 — 46,XY;del(2)(p16–pter), care anterior nu a mai fost niciodată descris. Au fost studiate, de asemenea, și cariotipurile întregii familii. Astfel, mama și o soră a pacientului au fost descoperite a fi purtătoare ale translocației t(2;8)(p16–q24.3).

Se mai citează cazuri patologice cu deleția 4p și monosomiile parțiale: $1q^-$, $7q^-$, $8q^-$, $9p^-$, $9q^-$, $10p^-$, $11q^-$, $13q^-$, $14q^-$, $16q^-$, $18q^-$, $18p^-$, $21q^-$.

Numeroase deleții sunt înregistrate și în anemia Fanconi.

Existența deleției Xp, la un pacient hermafrodit adevărat cu cariotip 46,X,del(X)(p21.1;pter), a fost pusă în evidență, prin tehnica *Southern blotting*. În acest caz nu a putut fi depistată gena SRY (determinatoare a dezvoltării testiculare) în ADN din limfocitele sângelui periferic și din biopsia gonadică. Pacientul prezenta, de asemenea, o serie de anomalii somatice discrete. Studiile de replicare a cromozomului X din celulele limfoblastice ale pacientului au arătat că deleția a inactivat cromozomul X în toate celulele examinate. Se sugerează că fenotipul pacientului este cauzat de prezența alelei recesive pe cromozomul X total inactivat. Este pus în discuție rolul posibil al locusului Xp implicat în determinismul sexului masculin și legatura dintre deleția Xp și fenotipul intersexual.

Această deleție terminală Xp este asociată și cu localizarea genei responsabilă pentru displazia spondiloepifizară (SEDL) — Xp22.12;p22.31. SEDL este o anomalie recesivă X-lincată, caracterizată la bărbații afectați, prin statură mică, rezultând dintr-o creștere defectuoasă a vertebrelor. S-au analizat familii cu markeri ADN microsateliți neidentificați. Analiza evenimentelor de recombinare cu acești markeri arată că gena responsabilă pentru SEDL este localizată în Xp22, într-un interval aproximativ de 2 Mb.

Adiția sau trisomia parțială (atașarea unui segment cromozomal intercalar sau terminal).

- S-a semnalat adiția de material nedefinit pe brațul scurt al cromozomului 12 — *46,XX,12p*$^+$.

Mai frecvente sunt trisomiile parțiale $1q^+$, $2p^+$, $2q^+$, $3q^+$, $4q^+$, $5q^+$, $5p^+$, $6p^+$, $6q^+$, $7q^+$, $8q^+$, $9p^+$, $10p^+$, $10q^+$, $11p^+$, $13q^+$, $14q^+$, $15q^+$, $16p^+$, $16q^+$, $17q^+$, $18q^+$, $19q^+$, $20p^+$, $22q^+$.

Duplicația (consecința atașării pe un cromozom a unui fragment acentric, dislocat prin deleție de la cromozomul omolog) duce la supradozaj genic.

Izocromozomul — rezultă prin clivarea anormală, în plan transversal, a centromerului în anafază, sau prin ruperea în regiunea paracentromerică a cromozomilor dicentrici. În prima diviziune celulară care urmează producerii lor, izocromozomii apar sub forma unor cromozomi perfect metacentrici, alcătuiți din două brațe identice, în ce privește marcajul în benzi, dar în care ordinea benzilor este inversată (imagine în oglindă). Relativ frecvenți în limfoproliferarile maligne, izocromozomii par să confere avantaj selectiv celulelor purtătoare.

- *Izocromozomul de brațe lungi 17 – i (17q)* — figurează printre anomaliile întâlnite în faza blastică a leucemiei mielocitare cronice.
- Se mai citează în literatura de specialitate *i (21)*, *i (18)*, *i (5p)* — în carcinomul vezicii urinare, *i (12p)* — în tumori ale liniilor germinale.
- *Izocromozomul X.* S-a încercat definiția moleculară a punctelor de scindare asociate cu izocromozomul X uman și implicarea în mecanismele de formare. În formarea izocromozomului este implicat modelul de diviziune anormală transversală a centromerului. Folosind tehnica FISH cu cosmide și YAC au fost definite punctele de scindare ale cromozomilor Xq;i(Xq) monocentric și dicentric de la pacienți cu sindrom Turner. Șapte puncte de scindare pericentromerice diferite au fost identificate în 10 din 11cromozomi i(Xq), conținând cantități variate de material din Xp. Numai 1 din 8 cromozomi i(Xq) monocentrici a prezentat un singur semnal α-satelit, în concordanță cu modele clasice ce implică diviziunea deficitară a centromerului. Ceilalti 7 izocromozomi nu sunt în concordanță cu asemenea model și au puncte de scindare care se întind pe Xp11.21proximal. Trei cromozomi i(Xq) dicentrici au puncte de scindare în Xp11.22 și, prin urmare, conțin ≥12 Mb de ADN între centromer. Aceste date demonstrează că majoritatea punctelor de scindare din formarea i(Xq) sunt localizate în banda Xp11.2 și nu în centromerul însuși. De aici, s-a lansat ipoteza că mecanismul major în formarea i(Xq) implică secvențe din brațul scurt proximal care sunt predispuse la rupturi și reuniri între cromatidele surori sau cromozomi X omologi.

Inversia (apare în urma fragmentării cromozomale, urmată de rotirea cu 180° a fragmentului care poate să includă centromerul — inversie pericentrică, sau poate să nu-l includă — inversie paracentrică, apoi sudarea capetelor rupte).

- S-a semnalat prezența inversiei paracentrice pe cromozomul 1– *46,XX inv(1p)*.
- *Inv(16)(p13;q22)* — în leucemia mieloblastică acută ($M4_{eo}$)
- *Inv(14)(q11;q32)* — în leucemiile limfocitare
- *Inv(8)(q22.2;q23.3)* — în sindromul familial Klippel-Feil (KFS). KFS este caracterizat prin fuziunea vertebrală congenitală rezultată din segmentarea anormală de-a lungul dezvoltării axei embrionare. KFS este o boală heterogenă, adesea asociată cu malformații craniofaciale. Prima evidențiere a locusului genic pentru KFS s-a făcut în cromozomul 8q, unde a fost descoperită o inversie — inv(8)(q22.2;q23.3) care se asociază cu fuziunea vertebrală congenitală.
- *Inv(21)(q11.1;22.13)* — la unii pacienți cu mielopoieză anormală tranzientă (TAM). TAM este o reacție leucemoidă produsă ocazional în sindromul Down, la nou-nascuți. S-a lansat ipoteza că „homozigozitatea disomică“ în celulele trisomice 21 joacă un rol important în geneza TAM și că gena potențială TAM este cartată în regiunea 21q11. La un nou-născut ce prezenta TAM asociată cu sindromul Down cu cariotip 47,XY inv(21)(q11.1;q22.13),+ inv(21)(q11.1;q22.13) s-a constatat că gena potențială TAM este „fărâmițată“ de rupturile produse. Prin analiza FISH, utilizând clonarea cosmidică ce corespunde diverșilor markeri cu situs de secvențe repetitive marcate (etichetate)(*sequence-tagged-site* — STS) cartați în jurul regiunii 21q11.1–q11.2, s-a confirmat că punctul proxumal de scindare în inv(21) este localizat între două situsuri de secvențe repetitive (STS). Punctul de scindare proximal al inversiei este localizat lângă o regiune dublicată, identificată anterior, fiind omoloagă secvenței 21q22.1.

Translocația (relocarea unor segmente cromozomale în urma fragmentării și trecerii acestor segmente în alte situsuri, fie pe același cromozom (translocație, relocare), fie, mai ales, pe cromozomi neomologi. Translocația poate fi reciprocă, atunci când are loc ruperea simultană a doi cromozomi, urmată de schimbarea de segmente între cei doi cromozomi, segmente care poartă însă seturi diferite de gene. Prin asemenea remanieri pot rezultă cromozomi dicentrici. Astfel, se citează în literatura de specialitate — dic(9;12)(p11;p12). În cazul în care apar trei rupturi, una într-un cromozom și două în altul, urmate de desprinderea fragmentului din acesta din urmă și includerea sa între capetele libere ale primului cromozom, are loc o translocație nereciprocă. Există și translocație Robertsoniană, realizată prin fuziunea centrică, adică prin unirea fragmentelor ce păstrează centromerul. Aceste tipuri de translocații sunt cel mai frecvent întâlnite în populațiile umane. În unele cazuri patologice, translocația unor cromozomi specifici reprezintă markeri caracteristici în diagnosticare. Translocațiile sunt cele mai frecvente și caracteristice rearanjamente intercromozomale în neoplazii.

- *Translocația t(9;22)(q34;q11)* — cromozomul marker Ph^1 (Philadelphia) — în leucemia mielocitară cronică (LMC) (în regiunea 9q34 este localizată gena **c-abl**). În acest caz se citează și identificarea genei umane LIM-Hox, **hLH-2**, exprimată aberant în LMC și localizată pe cromozomul 9q33–34.1 — secvența implicată în această translocație. Gena umană LH-2 este un potențial factor transcripțional ce conține 2 regiuni bogate în cisteină (domeniul LIM) și un domeniu homeobox (Hox) de legare a ADN. Nivelul ridicat de expresie a **hLH-2** a fost observat în toate cazurile de LMC testate, indiferent de starea bolii. Gena **hLH-2** a fost cartată pe cromozomul 9q33–34.1, în aceași regiune ca și translocația reciprocă, care produce chimera BCR-ABL a cromozomului Ph^1. Apropierea genei **hLH-2** de punctul de scindare pe cromozomul 9 sporește posibilitatea activarii-cis prin translocația t(9;22)(q34;q11). În afară de descoperirea exprimării genei **hLH-2** în toate cazurile de LMC, această exprimare a fost observată și în malignitațile limfoide și în liniile celulare mieloide, dar nu și în cazuri primare de leucemie mieloblastică acută. Rolul genei **hLH-2** în dezvoltarea sau progresia leucemiei nu este cunoscut. Totuși, gena **hLH-2** se poate dovedi utilitară ca marker al LMC, pentru monitorizarea bolilor reziduale.
- *Translocația t(8;21)(q22;q23)* — în leucemia mieloblastică acută (LMA) M2 (în regiunea 8q22 este localizată gena **c-mos**).
- *Translocația t(15;17)(q22.24;q11.21)* – în LMA — M3 (în regiunea 17q11.21este localizată gena **c-erb**).
- *Translocația t(16;16)(p13;q22)* – în LMA — M4.

- *Translocația t(9;11)(p21.22;q23)* – în LMA — M5.
- *Translocația t(6;9)* – în leucemia bazofilică. În ceea ce privește harta genetică a cromozomului 6, brațul scurt 6p a fost mult în atenția geneticienilor, prin localizarea în el a complexului major de histocompatibilitate (HLA). Mai recent, interesul a fost concentrat pe 6q din cauza faptului că poartă gene importante în evoluția tumorilor: melanomul malign — t(1;6), leucemia limfocitară acută a celulelor T-del(6q), limfomul non-Hodgkin a celulelor B — implică 6q, cancerul mamar, cancerul ovarian și locusul genei pentru diabetul de tip I. Locii pentru aceste boli sunt concentrați în regiunea telomerică 6(q25;27).
- *Translocația t(8;14)(q24;q33)* — în limfomul Burkitt, asociată cu gena **c-myc** cartată pe cromozomul 8q24.
- *Translocația t(14;15)* — stă la baza sindromului Prader-Willi.
- *Translocația t(7;15)* — este asociată cu pierderea mozaicată a 15(q11;q13), la pacienți cu hipomelanoza Ito, caracteristicile fiind retardarea mentală, tulburări comportamentale și anomalii ale pigmentației. Analizele citogenetice în hipomelanoza Ito au dovedit mozaicism pentru o translocație neechilibrată, cariotipul fiind 45,XY,-7,-15,+del(7)(7;)t(q34;q13)/46,XY. Acest pacient este, deci, monosomic pentru 7q34;qter și 15pter;q13 în celulele ce conțin translocația. Omologul uman **P** al genei **p** (produsul locusului *pink-eyed dilution* de la șoareci) se află pe cromozomul 15q11;q13. Pierdereea acestui locus se crede a fi asociată cu anomalii care sunt observate, de asemenea, și la pacienții cu deleția 15q11;q13, în sindromul Prader-Willi și Angelman. Mutațiile din interiorul genei **P** au fost, de asemenea, asociate cu albinismul oculocutanat (tip II) tirozină-pozitiv. Folosind tehnica FISH, s-a confirmat faptul că pacientul prezenta deleția unei copii a genei **P**, în celulele cu translocație neechilibrată, și pentru locii din interiorul regiunii critice pentru sindromul Prader -Willi și sindromul Angelman.

În literatura de specialitate se citează fragmentul 15q11.2;q12 ca fiind implicat în replicarea asincronă a ADN, fiind o dovadă citogenetică pentru imprintingul maternal și replicarea întârziată.

În acest caz, a fost studiată cinetica replicării ADN al regiunii 15q11.2;q12 în sindroamele Prader-Willi și Angelman. Tehnica BrdU — Hoechst 33258 — Giemsa a fost utilizată în analiza și compararea modelelor replicării târzii în regiunea 15q11.2;q12 între omologi. Replicarea asincronă între omologi a fost observată atât în amniocite, cât și în fibroblastele studiate. În celulele cu markerul 15 de origine parentală, segmentul patern cunoscut 15q11.2;q12 a fost replicat mai devreme decât cel matern, în 92–95% dintre metafazele asincrone. Restul de 5–8% de metafaze asincrone au prezentat o replicare maternă timpurie / paternă târzie. Acest model mozaicat de replicare a regiunii 15q11.2;q12 se poate datora mozaicismului metilării în imprintingul genomic sau unei lipse relevante de autocontrol a replicării. Aceste rezultate furnizează dovada citogenetică a imprintingului matern și replicarea întârziată în regiunea 15q11.2;q12.

- *Translocația t(14;14)* — asociată cu hipersensibilitatea VP16 și creșterea recombinării defectuoase în limfocitele pacienților cu ataxia telangiectazia (AT) este caracterizată de t(14;14)(q14;q32) în tandem. Pacienții cu AT prezintă grade diferite de imunodeficiență și o predispozitie mai mare decât normal la malignități limfoide. Celulele AT sunt caracterizate prin instabilitate cromozomală spontană, rezultând rupturi cromozomale și rearanjamente cromozomale non-randomice. Studiile citogenetice pe limfocitele T, de la pacienți cu AT, au arătat o dezvoltare progresivă a unei clone, purtând o translocație în tandem t(14;14)(q11;q32). Clona anormală prezinta rearanjamente cromozomale spontane, cu o frecvență mai mare față de celulele non-clonale. Numai în celulele clonale s-au observat două rearanjamente particulare predominante: cromozomi izodicentrici și asocieri telomerice derivate din recombinarea greșită.

Instabilitatea cromozomală indusă de VP16 — un inhibitor al ADN topoizomerazei II, a fost evaluată în termenii frecvenței rupturilor cromozomale și SCE.

Limfocitele T ale pacienților AT au arătat o hipersensibilitate la VP16 semnificativ mai mare decât limfocitele T normale. Instabilitatea cromozomală indusă de VP16 este semnificativ mai mare în celulele clonale, decât în celulele non-clonale, în timp ce instabilitatea cromozomală indusă de bleomicină (un medicament radiomimetic) nu prezintă o diferență semnificativă în cele 2 subpopulații limfocitare AT.

Instabilitatea cromozomală spontană diferită în celulele clonale și non-clonale împreună cu manifestarea lor diferită după tratament numai cu VP16, sugerează că celulele clonale purtătoare de translocație tandemică pot determina o creștere a recombinării greșite.

Dată fiind prezența translocațiilor t(14;14)(q11;q32) în leucemiile prolimfocitare-T și în tumorile celulelor T la pacienții cu AT, se sugerează că VP16 poate fi considerat un tratament anti-neoplazic indicat, în particular, la astfel de pacienți.

Translocațiile neechilibrate sunt cauza avorturilor spontane sau a sindroamelor, a multiplelor handicapuri fizice si mentale.

Cromozomi inelari (rezultat al autofuziunii distale datorită deleției telomerice). Cromozomii inelari monocentrici se deosebesc de inele acentrice, în afară de prezența centromerului, prin aceea că lângă ei se găsesc și fragmentele perechi, care însoțesc cromozomul inelar (*ring*).

Cel mai răspândit caz în acest sens este *sindromul cromozomului 14 inelar* — 46,XX,r(14)(p13;q13). Se mai citează *18r* — sindromul retardării mentale, *13r*, *15r*, *17r*, *22r* — toate cazurile prezintă aspectul clinic major — retardare psiho-motorie.

Prin tehnica FISH, s-a urmărit detectarea aberațiilor cromozomale în limfocitele umane, în cursul primelor trei diviziuni de postiradiere.

Celulele au fost crescute în prezența BrdU și colectate la diferiți timpi. După colorarea diferențiată a SCE, celulele analizate au fost identificate a se afla în I, II sau III mitoză după iradiere.

S-a constatat că frecvențele fragmentărilor cromozomale și ale cromozomilor dicentrici au arătat o creștere de aproximativ 50%, după fiecare generație celulară, în timp ce translocațiile erau mai persistente. Celulele aflate în diviziune postiradiere prezentau o frecvență mai mare a aberațiilor atunci când proveneau din probe colectate mai târziu, inducând o întârziere în dezvoltarea celulelor aberante.

În consecință, frecvența cromozomilor dicentrici sau a fragmentărilor cromozomale rămâne aproximativ constantă la diferite perioade de timp de colectare, atunci când parametrii ciclului celular nu sunt luați în considerație. Astfel, vârsta medie a unei generații limfocitare are un efect clar asupra frecvenței aberațiilor obținute. Metoda descrisă permite studiul persistenței alterărilor cromozomale timp de trei diviziuini celulare consecutive, prin folosirea tehnicii FISH.

3. ALTE MODIFICĂRI GENOMICE

3.1. STRUCTURILE *DOUBLE MINUTES* (DM) ȘI *HOMOGENEOUSLY STAINING REGIONS* (HSR)

Modificarile cantitative sau calitative ale informatiei conținute în materialul genetic al celulelor determină apariția stării patologice.

Creșterea de zeci sau sute de ori a numărului de copii ale unei gene (amplificare genică) este rezultatul unui proces complex care începe prin duplicarea unei secvențe ADN; multiplicarea ulterioară a numărului de repetiții ale secvenței duplicate inițial se realizează prin evenimente succesive de crossing-over somatic inegal.

Când activitatea unui produs genic esențial devine insufucientă fie prin mutație, fie din cauza prezenței unui inhibitor specific, celule mutante care supraviețuiesc deficienței pot fi adesea puse în evidență. Printre unele celule mutante, o proporție substanțială este viabilă, deoarece acestea supraproduc produsul genic. Multe au căpătat multiple repetiții tandemice ale genei deficiente, și multiple copii genice produc o superabundență de ARNm, de polipeptide corespunzătoare. Celulele bacteriene și o varietate de celule eucariote în cultură suferă asemenea amplificare genică. Asemenea amplificări se produc și în celulele tumorale.

Consecințele amplificării genice sunt: supraproducția proteinei pe care o codifică gena amplificată și creșterea numărului de molecule țintă pentru mutațiile cu potențial oncogen.

Protooncogenele activate prin amplificare fac parte din trei familii de gene: **myc, erbB** și **ras**. O aceeași genă poate să fie amplificată în mai multe tipuri de tumori, după cum un anumit tip de tumoră poate să conțină copii multiple, aparținând mai multor familii de gene.

Protooncogena **N-myc** este amplificată predominant în tumori de origine neurală sau neuroendocrină, **L-myc** — în carcinoame pulmonare, iar **c-erbB1** — în carcinoame esofagiene, ale capului și gâtului și în glioblastoame.

Deși semnificația amplificării genice nu este pe deplin clarificată, există temeiuri suficiente pentru a o incrimina ca factor determinant al accelerării evoluției tumorilor. Amplificarea genică este cu mult mai frecvent observată în tumorile mari, cu grad redus de diferențiere și care și-au dobândit capacitatea de metastazare. S-a evidențiat, de asemenea, o asociere strânsă între amplificarea genică și inactivarea genei **p53** — eveniment tardiv în evoluția tumorală. Deoarece genele amplificate în neoplasme aparțin tuturor celor trei compartimente de semnalizare intracelulară (membrană plasmatică, citoplasmă și nucleu), este foarte probabil că amplificarea și supraexprimarea unei astfel de gene să determine un răspuns mai eficient al celulei canceroase la nivelele scăzute ale factorilor de creștere din mediu, asigurându-se în acest mod proliferarea celulelor maligne în condiții de mediu în care o celulă fără amplificări ale oncogenelor ar rămâne blocată în faza G_0 a ciclului celular.

Expresia citogenetică a amplificării genice o constituie regiunile cromozomale omogen colorate și structurile cromatiniene *double minutes.*

Structurile cromatiniene *double minutes* (DM) (Fig. 1) se prezintă ca perechi de elemente cromatiniene mici, acentrice. Ele conțin aproximativ 1000–2000 kb de ADN fiecare și se autoreplică. Acestea nu participă la reglarea diviziunii mitotice, segregând într-un model randomic și producând o distribuție inegală în celulele fiice, putând fi pierdute în timpul micronucleației. Peste 20 de asemenea structuri au fost descoperite în linii celulare rezistente la metotrexat (MTX). DM au fost subiectul de studiu al grupului de cercetători condus de A. Levan (Suedia), care considera că acestea reperezintă mecanisme de amplificare a genelor stimulatoare ale creșterii tumorale. DM au fost identificate în: tumori ascitice de șoarece, neuroblastoame, meduloblastoame, rabdomiosarcoame și mieloame, precum și alte tumori maligne și linii celulare stabilizate, provenite din țesuturi tumorale. Originea și rolul DM în celulele tumorale sunt încă incomplet clarificate.

În literatura de specialitate se citează detectarea amplificării oncogenei **c-myc**, la un pacient cu leucemie mieloidă cronică în faza blastică ce prezenta structuri DM. Analiza citogenetică la acest pacient a arătat prezența a numeroase structuri DM și anomalii cromozomale complexe, incluzând cromozomul marker Philadelphia (Ph^1). Utilizând tehnica PCR, s-a investigat retrospectiv spațiul de amplificare a genei **c-myc** în ADN extras.

S-a estimat, că gena **c-myc** a fost amplificată de ~ 6,8 ori. Această descoperire sugerează că gena **c-myc** este amplificată în DM și această amplificare genică contribuie la progresia spre leucemia acută sau la creșterea rapidă a celulelor leucemice.

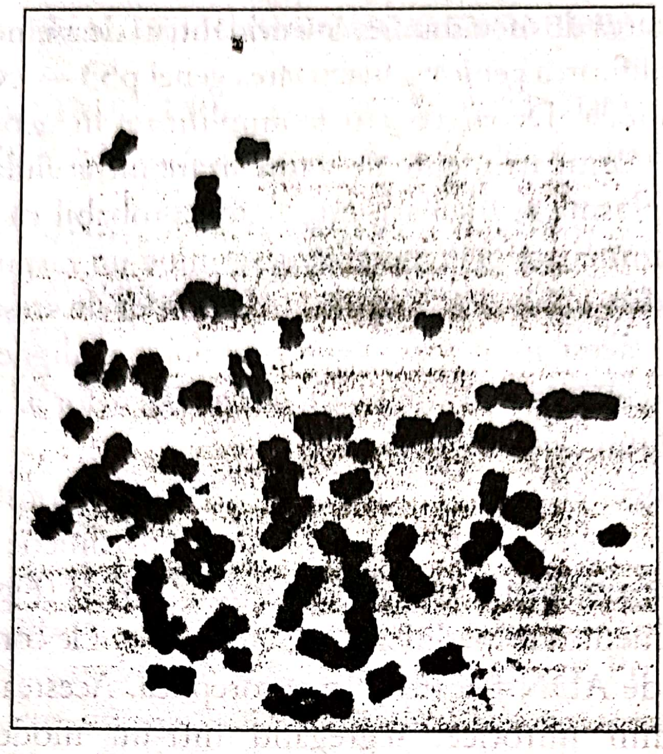


Fig. 1 — Structuri DM (sageti) în metafaza
(A. Harvey, Chromosomes, the complex code, 1996)

Gavrilă și colaboratorii (2002) au evidențiat prezența DM în limfocite umane analizate din probele de sânge supuse iradierii beta-electronice sau iradierii gamma (Fig.2), recoltate de la persoane sănătoase, precum și în sângele periferic recoltat de la bolnavi de leucemie. De asemenea, structuri

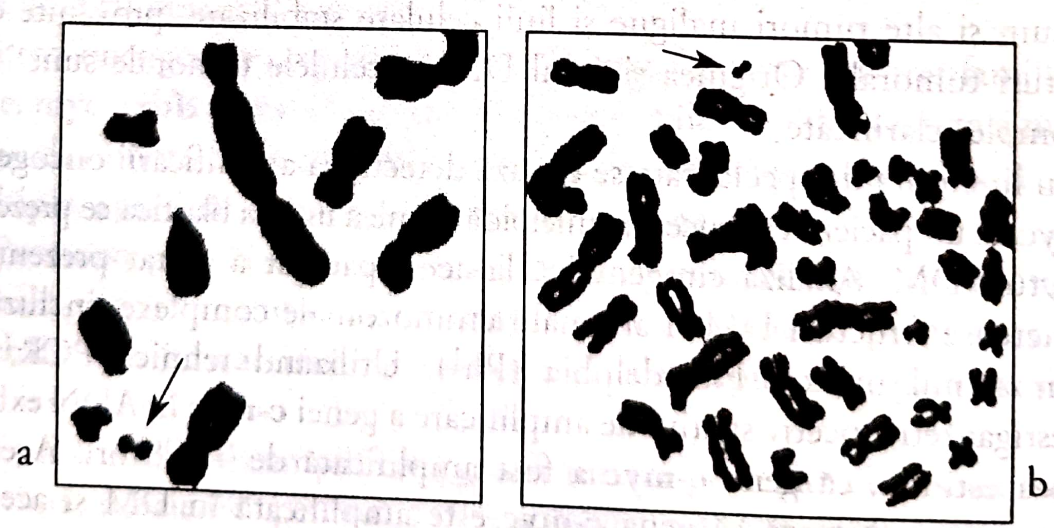


Fig. 2 — Structuri DM (săgeți) în limfocite umane analizate pe preparate din sânge supus iradierii beta-electronice (original)

DM au fost evidențiate cu o frecvență mai mare decât la om, în maduva hematopoietică a șoarecilor supuși iradierii beta electronice.

În aceste cazuri (figura 2 a și b) prezența DM nu mai poate fi pusă în legatură cu fenomenul de amplificare a oncogenelor ci, mai curând, a genelor legate de mecanismele de reparare postiradiere a leziunilor din ADN, sau altor mecanisme.

Regiunile omogen colorate (*Homogeneously staining regions — HSR*) (Fig. 3) sunt vizualizate ca segmente cromozomale interstițiale sau terminale, în care structura în benzi este foarte vagă sau lipsește complet, și care conduc la creșteri semnificative ale lungimii cromozomilor. În unele linii celulare și tumori maligne s-a observat, prin utilizarea metodelor de colorare diferențiată a cromozomilor, că unii markeri caracteristici prezintă zone omogen colorate, nebandate, care nu pot fi identificate în cariotipul original. Zonele HSR au fost considerate gene amplificate, reprezentând mecanisme de schimbare a echilibrului genic în favoarea rezistenței crescute la factorii de mediu sau la acțiunea de protecție a gazdelor, a celulelor tumorale sau a celulelor cultivate pe termen lung.

Aria HSR-urilor se referă la lungimea secvenței amplificate și numărul multiplicării ei. Se presupune că amplificarea se produce la situsul genei rezidente responsabile. De exemplu, HSR au fost descoperite în linii celulare de șoarece rezistente la metothrexat (MTX), care sunt plasate în mijlocul

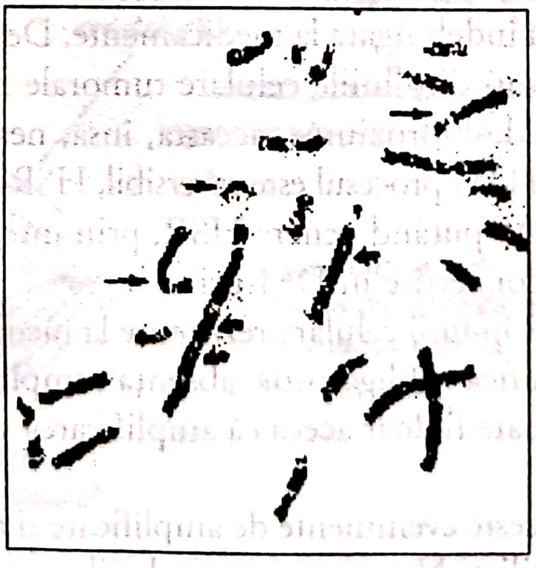


Fig. 3 — Celulă leucemică umană rezistentă la metotrexat cu HSR-uri în 3 cromozomi marker (săgeți) (Bertino et al, 1982)

cromozomului 2, în situsul genei **dhfr** (dihidrofolatreductaza, produce rezistență la MTX). Multiple HSR se pot produce în celule ca rezultat al mai multor evenimente de amplificare sau ca rezultat al rupturii și translocației HSR-urilor originale.

Aceste două elemente genetice — DM și HSR — sunt prezente aproape constant în celulele care au dobândit rezistență multiplă la medicamente. Acești echivalenți citogenetici ai amplificării genice sunt observați doar ocazional în cancerele umane, înainte de începerea chimioterapiei. Totusi, anumite tumori, în special neuroblastoamele, sunt purtătoare de DM sau HSR, încă de la debutul clinic. Unele secvențe ADN, a căror amplificare conduce la formarea de DM și HSR, au fost demonstrate a fi protooncogene, iar creșterea numărului de copii ale unei protooncogene reprezintă unul dintre mecanismele răspunzătoare de inițierea și progresia neoplaziilor, reprezentând de fapt, unul dintre mecanismele de amplificare a acestora.

O trecere în revistă a peste 200 de tumori primare a arătat că peste 91% din acestea conțin structuri DM, 6,5% — HSR și 2,5% — ambele structuri.

Structurile DM și HSR reprezintă manifestări alternative ale fenomenului de amplificare genică. Aceste două forme de ADN suplimentar sunt privite ca diferite expresii ale unuia și aceluiași mecanism genetic, în care DM se crede a fi precursori instabili ai HSR-urilor. O dovadă pentru această afirmație este creșterea considerabilă a substituirii DM cu HSR, în liniile celulare cu rezistență îndelungată la medicamente. De asemenea, s-a arătat că DM pot fi eliminați din liniile celulare tumorale mamaliene, folosind concentrații scăzute de hidroxiuree, aceasta, însă, neafectând HSR-urile. Rezultă, dacă în cazul DM procesul este reversibil, HSR-urile, sunt „achiziții“ stabile ale celulei; DM putând genera HSR, prin integrare cromozomală, ele nemaiputând fi convertite în DM-uri.

Lipsa DM și HSR în linii celulare rezistente la medicamente sau în linii tumorale nu semnifică obligatoriu absența amplificării materialului genetic; explicația poate fi doar aceea că amplificarea s-a produs, dar la un nivel nedetectabil.

Legătura dintre aceste evenimente de amplificare și rezistența la medicamente este bine stabilită. Natura exactă a relațiilor acestor evenimente cu cancerele este încă neclară, totuși, definirea clară a acestora se bazează pe identificarea secvențelor amplificate și efectul lor. Deși regiunile amplificate reprezintă arii relativ mari ale ADN pentru clonare, chiar dacă limitele genei și secvențele ei sunt diferite, este dificil să se identifice funcția genei dacă nu se corelează cu alte secvențe din baza de date a secvenței genice respective.

Cum se produc aceste structuri? Schimke (1988) a propus un model bazat pe replicarea saltatorie (*saltatory replication*) (Fig. 4). Trăsătura principală a modelului este probabilitatea că replicarea poate fi inițiată în aceleași origini de mai multe ori (nu numai o dată) în oricare fază a ciclului celular. În plus, s-a propus că replcarea ADN și procesul de elongație încetinește sau se oprește la un situs din interiorul cromozomului, înainte de întâlnirea cu bifurcația de replicare, dintr-o origine adiacentă a replicării. Urmarea acestor runde suplimentare de replicare, este producerea de multiple segmente de ADN atașate la un situs cromozomal, în maniera *„onion skin“*, adică în maniera înfășurării în bulbul de ceapă a foițelor

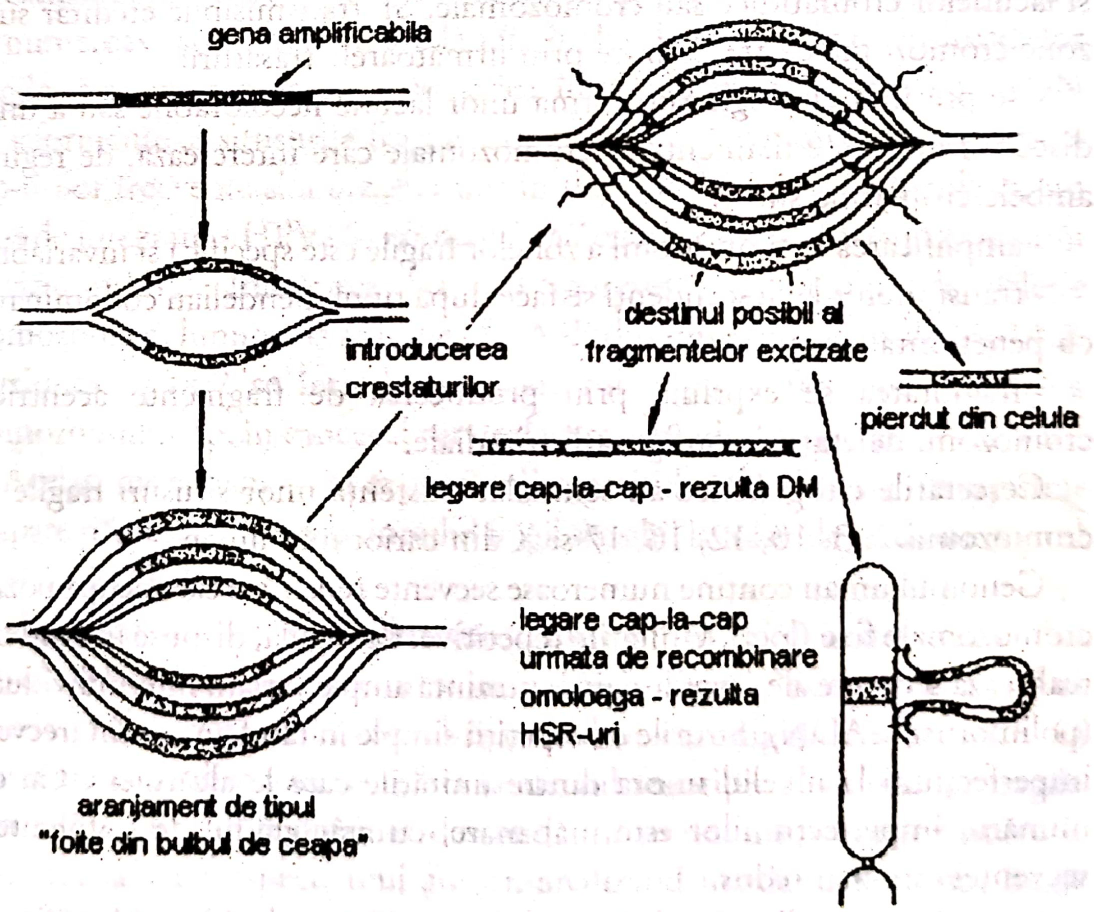

gena amplificabila
introducerea crestaturilor
destinul posibil al fragmentelor excizate
pierdut din celula
legare cap-la-cap - rezulta DM
legare cap-la-cap urmata de recombinare omoloaga - rezulta HSR-uri
aranjament de tipul "foite din bulbul de ceapa"

Fig. 4 — Modelul de formare a structurilor DM și HSR bazat pe replicare disproportionată (A. Harvey, 1996)

acestuia. Aceste segmente suplimentare pot fi eliberate într-o formă fie lineară, fie circulară. Ele pot fi pur și simplu pierdute din celulă fără nici un efect, sau, ca rezultat al administrării unor medicamente, are loc replicarea și ligarea acestor segmente cu generarea de DM. Ligarea cap-la-cap, urmată de recombinare cu un cromozom poate produce HSR.

Nu se cunoaște foarte clar cum se produc exact aceste evenimente sau cum sunt ele controlate, totuși, devine evidentă clar implicarea aparatului nuclear de replicare.

3.2. SITUSURILE FRAGILE

Situsurile fragile (SF) sunt reprezentate de anumite regiuni cromozomale, cu o localizare constantă, la care se remarcă o incidență crescută a rupturilor și lacunelor cromatidice sau cromozomale. SF transmisibile ereditar sunt zone cromozomale caracterizate prin următoarele trăsături:

- se prezintă citologic sub forma unor lacune necolorabile sau a unor discontinuități ale filamentelor cromozomale care interesează, de regulă, ambele cromatide surori.
- amplificarea în cromozomi a zonelor fragile este specifică și invariabilă.
- transmiterea la descendenți se face după tipul mendelian codominant, cu penetranță completă.
- fragilitatea se exprimă prin producerea de fragmente acentrice, cromozomi deletați și configurații triradiale.

Cercetările citogenetice au semnalat existența unor situsuri fragile pe cromozomii 2, 3, 10, 12, 16, 17 și X din cariotupul uman.

Genomul uman conține numeroase secvențe repetitive care ocupă poziții cromozomale fixe (loci). Unitățile repetitive, de regulă, dispuse în tandem, realizează secvențe ale căror lungime prezintă ample variații interindividuale (polimorfisme ADN). Șirurile de repetiții simple în tandem conțin frecvent imperfecțiuni la nivelul unora dintre unitățile care le alcătuiesc. Cu cât numărul imperfecțiunilor este mai mare, cu atât gradul de stabilitate a secvenței este mai redus.

Funcțiile repetițiilor simple în tandem sunt încă neelucidate. Identificarea recentă a unor proteine, având capacitatea de a se lega specific la anumite repetiții di- și trinucleotidice, sugerează că acestea din urmă nu sunt funcțional inerte. În plus, una dintre repetiții s-a demonstrat că acționează ca situs preferențial de asamblare a nucleosomilor, *in vitro*.

Secvențele formate din repetiții simple în tandem sunt susceptibile de a suferi modificări ale numărului de copii din care sunt alcătuite și, implicit, ale lungimii lor (expansiuni, regresii). În majoritatea lor, variațiile numerice ale microsateliților sunt lipsite de efecte fenotipice. Excepțiile le constituie expansiunile repetițiilor trinucleotidice CCG și AGC. Mutațiile dinamice ale acestor triplete conduc la formarea unor situsuri fragile asociate cu retard mental și, respectiv, la apariția unor afecțiuni neurodegenerative.

Situsul fragil frecvent 3p14.2 (FRA3B) este situsul cel mai sensibil, din cromozomii umani normali, pentru formarea *gap*-urilor și *break*-urilor, când replicarea ADN este perturbată de stresul afidicolinei și folatului. Deși se cunoaște că situsurile fragile rare apar prin expansiunea repetițiilor CCG, mecanismul responsabil pentru situsurile fragile frecvente este necunoscut. În numeroase studii referitoare la rata înaltă de recombinare a situsurilor fragile, s-a arătat o asociere statistică între integrarea virusurilor ADN transformante și situsurile fragile cromozomale. S-a constatat că o arie a *gap*-urilor frecvente și a *break*-urilor în interiorul FRA3B coincide cu un situs de integrare a HPV16 (*Human Papiloma Virus-16*), într-un carcinom cervical primar. Integrarea HPV16 sporește evenimentele de deleție cromozomală, limitată la regiunea FRA3B din interiorul situsului 3p14.2. Porțiunea 3p14.2 se întinde în interiorul regiunii frecvent deletate a cromozomului 3p, în cancerul cervical, care este adesea asociat cu HPV16.

Același mecanism — al expansiunii repetițiilor CCG – s-a demonstrat că apare și în cazul formării situsului fragil sensibil la folat, de pe cromozomul 16p13.11 (FRA16A).

Variabilitatea manifestărilor situsului fragil în celulele indivizilor din cadrul aceleeași familii, precum și între diferite tipuri de celule de la același individ, a fost relatată în cadrul mai multor investigații citogenetice. O problemă mult discutată se referă la efectul fenotipic al situsurilor fragile și la riscul pe care îl prezintă descendenții purtătorilor acestor situsuri. Referitor la acest aspect, unii autori, analizând incidența situsului fragil 16q21 la părinții unui lot de copii la care se exprimă acest situs, constată o relație nesemnificativă cu patogeneza. În schimb, s-a semnalat prezenta acestui situs fragil la cuplurile cu avorturi spontane repetate. Alți autori au remarcat o frecvență crescută a rupturilor cromozomale în poziția 16q21, la părinții unor copii cu anomalii cromozomale structurale *de novo*.

Un alt situs fragil a fost semnalat pe brațul lung al cromozomului 12q13, la copiii cu diferite malformații. Exprimarea acestui situs fragil a fost semnalată prin rupturi și lacune cromatidice și izocromatidice, deleții, precum și apariția unor interschimburi complexe, triradiare, rezultate în urma endoredublicării selective a fragmentelor de cromatide cuprinse între lacunele izocromatidice și telomere.

Până în prezent, au fost identificate peste 30 de SF transmisibile ereditar. Exprimarea acestor SF necesită condiții speciale de cultivare a celulelor și este indusă specific de anumiți agenți: unele SF sunt sensibile la antagoniști ai acidului folic și la inhibitori ai timidilat-sintetazei, altele — la distamicina A, bromodeoxiuridina (BrdU), netropina, interferon, etc. Frecvența SF transmisibile ereditar este redusă: doar 0,2–0,5% dintre indivizi sunt purtători ai unuia sau mai multor SF.

Semnificația patologică majoră a SF rezultă, însă, din faptul larg acceptat, că aceste alterări ale structurii cromozomilor sunt generatoare ale unui risc notabil de dezvoltare a neoplaziilor maligne. Explicația acestui fenomen este fundamentată pe următoarele observații:

- localizarea pe cromozomi a unora dintre punctele de rupere implicate în formarea rearanjamentelor neîntâmplătoare din cancere coincide cu sediul unor SF.
- la nivelul unor SF, sau în imediata lor vecinătate, se află oncogene sau gene supresoare ale creșterii tumorale.
- la bolnavii cu unele forme de cancere, precum și la rudele acestora, frecvența exprimării unor SF rare este mai mare decât în populația generală.

Pe baza acestor date se poate imagina un scenariu al malignizării în care rolul principal revine situsurilor fragile:

- spontan sau sub acțiunea carcinogenilor din mediu, fibra cromozomală se rupe în zona de minimă rezistență, reprezentată de un situs fragil;
- în situația în care capetele rupte nu se reunesc, segmentul distal se elimină;
- dacă în acest segment este localizată o genă supresoare de tumori a cărei corespondență de pe cromozomul omolog fusese anterior inactivată printr-o mutație, rezultă așa-numita stare de pierdere a heterozigozității (*loss of heterozygozity — LOH*): celula deprivată de ambele exemplare

ale genei supresoare de tumori scapă de sub controlul mecanismelor care asigură homeostazia proliferării și se transformă într-o celulă neoplazică.

Un scenariu asemănător se aplică și situației în care filamentele cromozomale suferă rupturi multiple:

- dacă una dintre rupturi interesează un situs fragil, la nivelul căruia se află o protooncogenă, reunirea ilegitimă a capetelor rupte se poate solda cu:

- plasarea protooncogenei în juxtapoziție cu elementele reglatoare (promotori, intensificatori) ale unei gene transcripțional active;

- fuzionarea protooncogenei cu o genă, de asemenea, transcripțional activă. În prima variantă, rezultatul este dereglarea transcripțională a protooncogenei (supraexprimarea), iar a doua — sinteza unei oncoproteine himerice. În ambele variante, consecința este aceeași: producerea unui eveniment esențial pentru inițierea sau progresiunea neoplaziilor.

3.2.1. SINDROMUL X FRAGIL

Acest sindrom a fost descris, prima dată, în anul 1969, și ulterior, în timpul anilor '70. El este cauza cea mai frecventă a retardării mentale, după sindromul Down.

Unul dintre situsurile fragile transmisibile ereditar — cel situat pe brațul lung al cromozomului X, în poziția q27.3 [fra (X)(q27.3)] (Fig.5) este răspunzător de producerea anomaliilor fenotipice care definesc sindromul X fragil (caracterizat la barbați prin retardare mentală, macroorhidie și displazie a tesutului conjunctiv).

Cercetările ulterioare au remarcat asocierea situsului fragil Xq27 la băieții cu retardare mentală. Sindromul se transmite X-lincat. SF de pe cromozomul X poate explica retardarea mentală la bărbații la care se exprimă și constituie un factor etiologic important la femeile cu retardare mentală moderată. Unele cercetări au sugerat o corelație pozitivă între purtători și proporția celulelor care prezintă fragilitate X. Se pare că exprimarea fenotipică se face în funcție de localizarea SF în cei doi cromozomi; atunci când frecvența lui este mare, cromozomul X activ poate fi implicat în retardarea mentală.

În populația generală, aproximativ 1 din 1250 bărbați și 1 din 2000 de femei sunt afectate.

În anul 1991 a fost caracterizată gena desemnată **FMR-1** (*Fragile X Mental Retardation 1*), responsabilă de expresia sindromului X fragil.

Factorii implicați includ: situsul unei repetiții trinucleotidice în tandem CGG prezentă într-un exon al genei **FMR-1**; și metilarea regiunilor CpG aflate cu 250 pb în fața repetiției trinucleotidice. Orice expresie anormală a acestor factori are ca rezultat — sindromul X fragil. Expansiunea acestei repetiții trinucleotidice se presupune a fi responsabilă pentru sensibilitatea cromozomului la folat. Persoanele normale din punct de vedere clinic au între 6–50 de asemenea repetiții. Sunt, însă, două situații mutaționale: I — este o premutație, ce prezintă 52–200 de repetiții trinucleotidice; un individ cu această premutație este simptomatic și purtător (30% — femei purtatoare și 20% — netransmițători). II — mutația totală, este descrisă ca prezentând peste 600 de repetiții (pot ajunge până la 1000 repetiții). Aceste situații sunt asociate cu metilarea zonelor CpG. Indivizii cu mutație totală prezintă exprimarea sindromului X fragil; toți bărbații afectați și 50% din femeile afectate prezintă grade variate de retardare mentală.

Premutația este instabilă și poate progresa spre mutație totală. Deși există niște îndoieli, în ceea ce privește mecanismul exact al acestei transfomări, se cunoaște că premutația se transformă în mutație totală, doar atunci când cromozomul FRAX este transmis pe linie maternă. Riscul acestei transformări crește exponențial cu creșterea numărului de repetiții prezente în premutația cromozomului purtător.

Un aspect interesant s-a constatat la pacienții cu FRAX: mutația totală poate să nu fie prezentă în spermă, fiind prezentă însă în limfocitele periferice. Se sugerează că transformarea premutației în mutație totală este postzigotică și nu se produce în meioză. Această idee se bazează pe observația că indivizii afectați sunt mozaicați pentru numărul de repetiții. Este posibil ca expansiunea sa aibă loc într-o anumită faza a dezvoltării embrionare.

Perioada expansiunii repetiției trinucleotidice se crede a cauza exprimarea citogenetică a sindromului X fragil; metilarea regiunii CpG fiind strâns corelată cu absența ARNm al genei **FMR-1**. Studiile embrionare au arătat că ARNm al genei **FMR-1** este prezent în materialul corionic în care metilarea nu a fost stabilită, dar nu și în țesuturile fetale, unde CpG este metilat. Metilarea nu se produce imediat, ci în jurul săptămânii a 11–a de sarcină.

Acest sindrom este exprimat, de asemenea, și în cazurile în care nu poate fi detectat citogenetic. În aceste cazuri se pare că sunt responsabile delețiile și mutațiile punctiforme ale genei **FMR-1**. Proteina codificata de gena **FMR-1** pare a fi înalt conservată la nivelul speciilor, dar variază la nivelul țesuturilor.

Utilizând tehnica PCR neradioactiv, electroforeza în gel de agaroză și Southern blotting, urmat de hibridizare cu sonde oligonucleotidice marcate cu digoxigenină $(CGG)_5$ și detectarea chemiluminiscentă, a fost definită întreaga mutație responsabilă pentru sindromul X fragil (amplificarea unei repetiții CGG în gena **FMR-1**, indică de la câteva sute la câteva mii de unități repetitive) la toți pacienții. Nu s-a observat nici o diferență între lungimea de repetiție CGG între pacienți și purtători. Totuși, utilizând tehnica PCR într-un diagnostic prenatal, s-a detectat numai o alelă normală la un fetus de sex feminin, în timp ce analiza *Southern blotting*, cu sondă marcată cu digoxigenină, a relevat prezența unei mutații complexe.

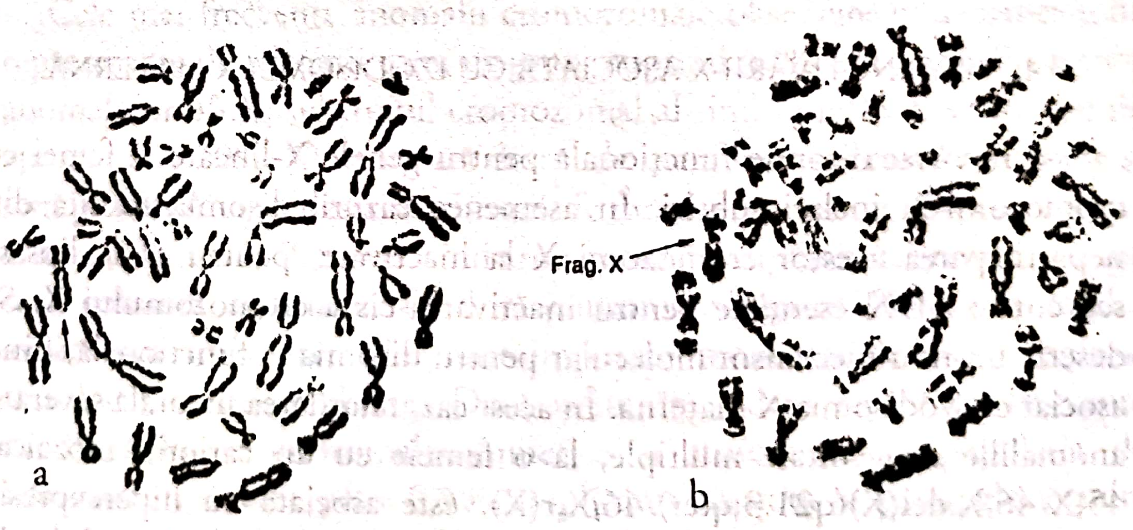


Fig. 5 — Cromozomul X fragil (săgeată) prezent într-o metafază colorată convențional (a) și bandată G (b) (S.C.Rooney, 1996)

3.3. CROMOZOMUL Y SATELITAT

În cursul translocației cromozomilor de sex, semnificativ este faptul că un braț scurt satelitat *de novo* a cromozomului Y ar putea rezulta dintr-o translocație nestabilă. Un braț lung satelitat al cromozomului $Y(Yq_S)$ este considerat o variație normală, în timp ce prezența unui satelit pe brațul scurt al lui $Y(Yp_S)$ nu a fost niciodată descrisă în literatură. Un cromozom Yp_S ar putea avea semnificație clinică, dacă translocația care conduce la Yp_S a relocat gena determinatoare de dezvoltare testiculară — SRY la alt cromozom. Purtătorul unei asemenea translocații prezintă, prin urmare, un risc crescut de a da naștere la descendenți masculi XX și femeli XY. Se descrie primul caz raportat a prezenței Yp_S *de novo* la un bărbat normal fenotipic.

Acest cromozom Yp_S a apărut pozitiv în bandare C și în colorație NOR și a arătat un semnal de hibridizare pentru secvența β-satelit.

Analiza FISH a arătat că gena SRY a fost reținută pe cromozomul Yp_S și capetele rupturii ce au dus la translocația pe Yp_S au fost distale față de regiunea pseudo-autozomală. În diagnosticul prenatal al fiului său s-a descoperit un cromozom Y normal și, astfel, satelitul de pe Yp_S a fost pierdut în timpul împerecherii meiotice Xp-Yp. Acest cromozom Yp_S este, cel mai probabil, produsul unei translocații nestabile.

3.4. LIPSA INCTIVĂRII X ASOCIATĂ CU IZODISOMIA X MATERNĂ

S-a raportat disomie funcțională pentru genele X-lincate la femei cu cromozomi X inelari subțiri. În asemenea cazuri, disomia rezultă din neparticiparea acestor cromozomi X la inactivare, pentru că le lipsesc secvențele ADN esențiale pentru inactivarea-cis a cromozomului X. Se descrie un nou mecanism molecular pentru disomia X functională, fiind asociat cu izodisomia X maternă. În acest caz, retardarea mentală severă și anomaliile congenitale multiple, la o femeie cu un cariotip mozaicat 45,X/46,X,del(X)(q21.3;qter)/46,X,r(X), este asociată cu hiperexpresia genelor din interiorul cromozomului X (pter;q21.31) în multe celule ale sale. Cromozomul X normal, cromozomul X inelar și cromozomul X linear deletat, proveniți din același cromozom X matern, toți sunt activi transcripțional. Transcriptul specific cromozomului X inactiv (*X Inactive Specific Transcript* — XIST) nu se exprimă, deși, locusul și regiunea centrului de inactivare potențială a lui X (*X Inactivation Center* — XIC) este prezent pe ambii cromozomi. Aceste rezultate arată că inactivarea-cis produce invariabilitate la femei ce au doi cromozomi X, chiar dacă regiunea XIC este prezentă pe ambii din ei. Totodată, ele furnizează dovada existenței unui timp critic mai important la atacul vizibil al inactivării X în embrion, când se produce inactivarea X și sprijină ipoteza că, imprintingul cromozomal este operant asupra cromozomului X.

Remanierile cromozomale pot afecta, practic, toți cromozomii. Ele sunt deosebit de grave, cel mai adesea, letale. Această situație se poate explica prin aceea că în evoluția sa, cariotipul uman a atins un grad înalt de stabilitate, astfel că orice abatere de la *pattern*-ul său, reprezentată fie de restructurări cromozomale, fie de modificări ale numărului de cromozomi, este cel mai adesea incompatibilă cu funcțiile normale ale organismului și este, în consecință, eliminată prin moartea individului purtător (moarte genetică).

La naștere, aproximativ 0,7–1% din copiii nou-născuți sunt purtătorii unei aberații cromozomale, dintre care 0,1–0,2% se apreciază a fi mutații echilibrate. Numărul lor ar fi, însă, cu mult mai mare, dacă s-ar lua în considerare că peste 60% din embrionii avortați spontan sunt purtători de aberații cromozomale.

Cele mai frecvente anomalii cromozomale observate în avorturi sunt reprezentate de trisomii care, ca grup, cuprind 52% din total. Frecvența anomaliilor 45,X, substratul cromozomal al sindromului Turner, este de aproximativ 20%. O incidență destul de mare o au avorturile triploide și tetraploide. Au fost descrise trisomii ale tuturor cromozomilor, cu excepția cromozomului 1. Prezența unui cromozom 18 suplimentar reprezintă cea mai comună anomalie, fiind răspunzătoare pentru 30% din totalul avorturilor trisomice. Mai sunt implicate monosomiile autozomale și translocațiile neechilibrate. Dacă avem în vedere faptul că frecvența modificărilor cromozomale numerice și structurale în populația de nou-nascuți este de peste 0,5%, implicarea acestora în patologie, rezultă necesitatea aplicării pe scară largă a testelor citogenetice. În contextul celor menționate, analizele citogenetice sunt edificatoare, mai ales pentru confirmarea sau infirmarea unui sindrom cromozomal. În acest sens, putem menționa că pentru unii adolescenți cu hipogonadism, care pot fi suspectați de sindrom Klinefelter sau pot fi implicate alte cauze în generarea aspectelor clinice respective, studiul cariotipului este edificator. De asemenea, se impune investigarea citogenetică a fetelor care nu prezintă malformații, însă, atrag atenția prin talia redusă. În aceste situații este necesară o analiză atentă a unui număr mare de celule, depistântu-se adesea pe langă celule normale și celule monosomice — X0.

Se recomandă studiul cariotipului la persoanele cu retardare mentală cu etiologie nestabilă, întrucât în unele cazuri s-au semnalat modificări cromozomale, o incidență crescută a unor variante cromozomale precum și exprimarea situsului fragil — Xq27.

Analiza cromozomală a polimorfismelor cromozomale stă la baza stabilirii originii cromozomilor supranumerari, atât la nou-nascuții afectați, cât și în cadrul avorturilor spontane.

Prin investigatii citogenetice ale părinților care au un copil cu o trisomie parțială sau o monosomie parțială se poate stabili dacă această modificare este determinată de o translocație echilibrată prezentă la unul din părinți sau a apărut sporadic. Acest lucru are o mare importanță în cadrul sfatului genetic, pentru stabilirea riscului recurent, întrucât pentru translocațiile moștenite, riscul recurenței este crescut față de cele sporadice, unde este foarte scăzut.

În leucemii se indică studiul cromozomilor în vederea confirmării diagnosticului hematologic. În acest sens, urmărind un anumit marker genetic, se poate observa evoluția clonală a liniilolr celulare leucemice. Trecerea leucemiei cronice printr-o fază blastică este însoțită de noi schimbări cromozomale.

Analiza atentă a rupturilor cromozomale poate furniza date precise pentru diagnosticul anemiei Fanconi.

La copiii care manifestă întârziere în dezvoltare nu este exclusă posibilitatea existenței unor modificări cromozomale și, de aceea, se impun investigații citogenetice pentru o orientare medicală corectă față de acești copii. În cadrul nou-nascuților cu ambiguitate genitală, testele citogenetice sunt necesare pentru stabilirea sexului genetic în vederea corectării corespunzătoare a anomaliilor urogenitale.

O deosebită realizare în citogenetica umană o constituie metodologia diagnosticului prenatal, prin care multe boli genetice grave pot fi detectate în perioada timpurie a sarcinii. Cercetarea citogenetică a celulelor fetale prelevate din lichidul amniotic poate stabili eventualele modificări cromozomale.

Din datele prezentate, rezultă că testele citogenetice constituie componenetele principale ale metodologiei sfatului genetic.

CAPITOLUL XLIII

ORGANIZAREA GENOMURILOR EXTRANUCLEARE

1. INTRODUCERE: PRINCIPII DE EREDITATE EXTRANUCLEARĂ

În covârșitoarea lor majoritate, caracterele ereditare sunt determinate de gene localizate în ADN nuclear. Comportamentul acestor gene este supus legilor mendeliene ale eredității și principiilor teoriei cromozomale a eredității, formulate de școala lui Th. H. Morgan. Transmiterea genelor nucleare este total dependentă de funcționarea normală a fusului de diviziune și desfășurarea normală a meiozei. În transmiterea de la părinți la descendenți a caracterelor ereditare mendeliene, cei doi genitori – matern și patern – contribuie în egală măsură la realizarea zestrei genetice a descendenților, cele două sexe fiind echivalente, din acest punct de vedere. Din această cauză, încrucișările reciproce: **AA**♀x**aa**♂ și **aa**♀x**AA**♂ au același rezultat și anume apariția în F_1 a organismelor heterozigote Aa, dintre acestea 50% sunt ♀ și 50% sunt ♂ (sex-ratio 1:1). Acesta este PRINCIPIUL IDENTITĂȚII HIBRIZILOR RECIPROCI, aplicabil, în condiții normale, tuturor cazurilor de ereditate nucleară (mendeliană). Există însă unele cazuri în care, în condiții normale, se înregistrează o abatere de la acest principiu, obținându-se rezultate diferite în asemenea încrucișări reciproce. Cel mai ilustrativ exemplu este cel al încrucișărilor dintre cal (**Equus cabalus**, 2n = 64) și măgar (**Equus asinus**, 2n = 62). Când iapa se încrucișează cu măgarul, rezultă hibridul numit *catâr*, care are 2n = 63 (32 de cromozomi, de la cal și 31 de cromozomi, de la măgar). Când măgărița se încrucișează cu armăsarul, rezultă hibridul numit *bardou*, care are tot 63 de cromozomi și, asemănător catârului, aceștia sunt 32 de la cal și 31 de la măgar. Ambii hibrizi sunt sterili, dar catârul este diferit de bardou, din multe puncte de

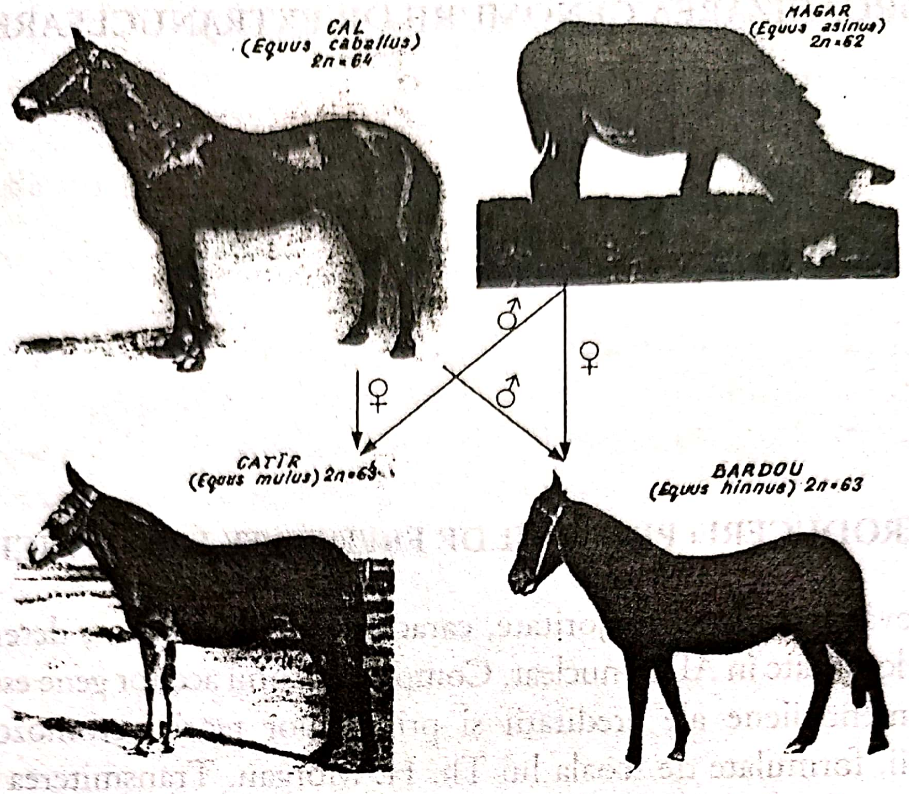


Fig. 1 — Transmiterea pe linia genomului matern (matroclin) a caracterelor ereditare extranucleare dovedită de neidentitatea hibrizilor reciproci (original).

vedere (fig. 1). Diferența dintre acești hibrizii reciproci – *catârul* și *bardoul* – este condiționată de organismul matern, participant la hibridare interspecifică: iapa condiționează formarea catârului, pe când măgărița condiționează formarea bardoului. Zestrea genetică nucleară a catârului este identică cu zestrea genetică nucleară a bardoului. Cine determină atunci o asemenea diferență? Diferența o dă mecanismul eredității extranucleare.

Primul care a sesizat fenomenul abaterii de la transmiterea mendeliană a unor caractere ereditare a fost Correns, unul dintre cei trei redescoperitori ai legilor lui Mendel. În anul 1909, lucrând pe planta ornamentală **Mirabilis jalapa**, el a constatat că variegarea frunzelor se transmite pe linia genitorului matern, în toate variantele de încrucișare, numind acest mod de transmitere, *ereditate matroclinală*. El a dat și o explicație transmiterii matroclinale, constatând că spermatiile (nuclei spermatici care sunt gameți masculi, la plante) nu conțin primordii de cloroplaste, pe când oosfera (gametul femel, la plante) conține asemenea primordii ale cloroplastelor. Aceasta a prezentat prima semnalare referitoare la existența unor determinanți genetici în cloroplaste. Ulterior, s-au identificat numeroase asemenea cazuri de ereditate matroclinală, la alte organisme, plante și animale. S-a constatat că între ovul și spermatozoid există diferențe evidente din punct de vedere al cantității de citoplasmă, ovulul având o bogată citoplasmă, cu numeroase organite intracitoplasmatice, incluzând mitocondriile, pe când spermatozoidul nu prezintă decât un strat pelicular de citoplasmă, în jurul nucleului, el fiind, în esență, „un pachet de ADN". Curând, s-a ajuns la concluzia că și în mitocondrii trebuie să fie determinanți genetici, responsabili de transmiterea matroclină a unora dintre caracterele ereditare. Asemenea determinanți genetici s-au numit **gene extranucleare** sau **plasmagene**, ansamblul lor fiind numit **plasmotip**, echivalentul genotipului, din ereditatea nucleară. Se mai utilizează și termenul de **plasmon**, echivalentul noțiunii de genom, din ereditatea nucleară.

În distribuția genelor nucleare, de la părinți la genitori, intervine fusul de diviziune, acest proces având loc în meioza (spermatogeneză și ovogeneză). Fusul de diviziune asigură o repartizare exactă, precisă, a cromozomilor și, respectiv, a genelor purtate în aceștia, din celula-mamă, în celulele-fiice, ce se vor diferenția în gameți. Dar nu același lucru are loc și în repartizarea genelor extranucleare, în care nu intervine un aparat fusorial sau alt mecanism care să asigure această echipartiție, distribuția genelor extranucleare realizându-se probabilistic, prin mecanismul citodierezei, adică al împărțirii citoplasmei la cele două celule-fiice. Distribuția randomizată a mitocondriilor sau a cloroplastelor în mixoplasma celulei aflată în diviziune face ca în cele două celule-fiice să fie repartizat un număr diferit de organite citoplasmatice și implicit, un număr diferit de determinanți ereditari extranucleari. În absența unui mecanism care să asigure o repartiție echilibrată a genelor citoplasmatice (plasmagenelor) în celulele-fiice, ereditatea extranucleară nu se supune legilor mendeliene ale eredității, având loc o transmitere exclusivă pe linia genitorului matern (matroclin), aceasta reprezentând caracteristica definitorie pentru acest tip de ereditate. Dar, la organismele cu reproducere sexuată, ereditatea extranucleară, manifestată prin transmitere matroclinală, are la bază particularitățile desfășurării microsporogenezei și macrosporogenezei, la plante, respectiv a spermatogenezei și ovogenezei, la animale. Aceste particularități determină ca în gameții masculi să nu fie repartizată citoplasmă și implicit organite citoplasmatice, decât în cantitate foarte mică, pe când în gameții femeli, se repartizează o cantitate mare de citoplasmă, aceștia având și o bogăție de organite citoplasmatice.

2. ORIGINEA MITOCONDRIILOR ȘI CLOROPLASTELOR PRECUM ȘI A CELULEI EUCARIOTE

Celula eucariotă are o organizare multigenomică, pe lângă genomul nuclear ea mai conține și genomuri extranucleare, reprezentate de structurile genetice din citoplasmă purtate de diferiți agenți infecțioși de origine virală sau bacteriană (particulele „killer“, la parameci, particulele sigma la drosofilă etc.) dar mai ales, de ADN din mitocondrii și ADN din cloroplaste, reprezentând genomuri înalt organizate, denumite **genom mitocondrial**, respectiv, **genom cloroplastic**.

Originea organitelor dotate cu aparat ereditar din citoplasma celulelor eucariote a constituit subiect major de dezbatere în biologia secolului al XX-lea. Pentru aceasta au fost enunțate mai multe ipoteze, dintre care, aceea care are în prezent cel mai solid suport științific, bazat pe date de biologie celulară și moleculară, este **teoria endosimbiozelor succesive** sau a **xenogenezei**, aplicată coerent de către cercetătoarea Lynn Margulis.

Potrivit teoriei endosimbiozelor succesive, la origine, mitocondriile și cloroplastele au fost celule procariote aerobe care au suferit mutații ce le-au permis să se adapteze la o atmosferă din ce în ce mai bogată în oxigen de origine biogenă, prin activitatea fotosintetizatoare aerobică (oxică) a bacteriilor fotosintetizatoare și mai ales a cianobacteriilor. În realizare acestei fotosinteze s-a trecut la utilizarea apei ca sursă de hidrogen, pentru reducerea CO_2. Asemenea procariote, devenite aerobe, utilizau oxigenul în arderile de substanțe organice, până la CO_2 și H_2O, cu producere și eliberare de energie, depozitată la nivelul ATP, de unde putea fi utilizată, la nevoie, în procesele metabolice celulare, așa cum se întâmplă în toate celulele actuale.

În perioada de „criză a oxigenului“ – cea de a doua criză ecologică de nivel planetar (după „criza nutrienților“), survenită acum aproximativ 1,8 miliarde de ani, când dezvoltarea cianobacteriilor fotosintetizante atinsese paroxismul, lăsându-și urmele în depozitele stromatolite, cele mai multe procariote anaerobe au dispărut, datorită neputinței de adaptare la oxigen care este un gaz corosiv, toxic. Unele dintre aceste procariote anaerobe sau retras în mediile anoxice, precum abisurile mărilor și oceanelor sau straturile geologice, bogate în petrol etc. Dar, șansa evolutivă cea mai mare au avut-o acele procariote anaerobe care, având dimensiune mai mare și capacitate de hrănire heterotrofă, prin „înghițirea“ unor celule mai mici, au „înghițit“ întâmplător prin endocitoză, un procariot mai mic, care devenise între timp aerob, prin mutație. În condiții anaerobe, procariotul mai mare poate descompune mai ușor un procariot mai mic, „înghițit“ în procesul obișnuit de hrănire. Acum însă, atmosfera oxică nu mai era propice pentru procariotul anaerob să-și manifeste plenar funcțiile, astfel că se comporta ca un organism „leșinat“, deși nu mort! În asemenea condiții, procariotul aerob mai mic, altădată victimă sigură, supusă destrucției, nu numai că a supraviețuit, dar i-a adus chiar și „ucigașului“ său de altădată salvarea, oferindu-i energie și prin aceasta relansându-i procesele metabolice la parametrii normali și chiar superiori. S-a constituit astfel o alianță din care au câștigat ambii parteneri ai luptei pentru viață, nemaiexistând învins și învingător, ci doar un triumf al vieții.

Funcțiile realizate de endosimbionți și anume metabolismul aerobic și fotosinteză, au devenit esențiale pentru gazde. Genele pentru aceste funcții și structurile care le asigurau substratul material al desfășurării lor au fost păstrate în decursul evoluției, pe când genele codificatoare ale altor funcții și structuri ale procariotelor endosimbionte au fost pierdute, astfel că și procariotele endosimbionte s-au metamorfozat, pierzând multe dintre caracteristicile avute ca celule libere, menținând doar pe unele dintre ele, suficiente însă să ateste natura lor de foste celule procariote libere, așa cum se înfățișează astăzi mitocondriile și cloroplastele. Așa se explică faptul că promotorii pentru expresia genică cloroplastică seamănă cu secvențele –35 și –10 din promotorii procariotelor actuale, iar ribozomii cloroplastici sunt foarte asemănători cu cei ai bacteriilor și cianobacteriilor actuale. Speciile de ARNr din cloroplaste sunt similare ca dimensiune și secvență cu cele din bacteria **Escherichia coli**, iar numeroase proteine ribozomale cloroplastice sunt înrudite imunologic cu proteinele ribozomale specifice de la acest procariot.

Traducerea pe ribozomii cloroplastici, ca și aceea din ribozomii bacterieni este inhibată de cloramfenicol.

ARNr mitocondrial de la plante prezintă afinități cu acela de la grupul **a** de bacterii purpurii în care se încadrează simbionți bine cunoscuți ai celulei vegetale de tip **Agrobacteria** și **Rhizobacteria**. Nu este exclus ca ribozomii și codul genetic al mitocondriilor actuale să fi derivat dintr-un procariot dispărut sau încă neidentificat de știință.

În prima fază a procesului multistadial al endosimbiozelor succesive, procariotul aerob a funcționat în celula anaerobă mai mare ca o protomitocondrie. S-a constituit astfel un amoeboid capabil de a se autoreproduce în atmosfera oxică, atât gazda cât și „înghițitul“ (din prima endosimbioză) autoreproducându-se sincron și dând o populație de asemenea sisteme eucariotice *in statu nascendi*, adică în devenire. În cadrul unei asemenea simbioze a avut loc o distribuire de funcții, realizându-se totodată o ierarhizare a proceselor de control. Protomitocondria a reținut unele funcții legate de respirația celulară și de autoreproducerea sa, dar ea s-a bucurat doar de o independență relativă, chiar și în executarea acestor funcții, deoarece controlul general al **sistemului amoeboidal** era exercitat de genomul gazdei. Acest control „centralizat“ al celulei gazdă s-a exercitat în primul rând asupra capacității de multiplicare a protomitocondriei, deoarece, în situația în care acest proces era scăpat de sub control, exista riscul distrugerii ansamblului, prin multiplicarea nestăvilită a „invadatorului“/„înghițitului“.

Protoctistul **Pelomyxa** constituie o enigmă a biologiei moleculare. Taxonomiștii au considerat că acesta este o amoebă. Analiza structurii sale a evidențiat faptul că este lipsită de mitocondrii. Acum oamenii de știință se gândesc să creeze pentru încadrarea ei taxonomică un nou regn de viețuitoare. **Pelomyxa** trăiește în condiții aerobe. Cine îi furnizează energia pentru reacțiile metabolice aerobe? O simbioză permanentă între acest microorganism și bacterii aerobe ce sunt asociate peretelui său celular îi oferă energia necesară vieții. S-ar mai putea produce endosimbioza azi? Se pare că nu! Au existat anumite condiții care au declanșat asemenea evenimente. *Evoluția vieții este ireversibilă!*

În cadrul unui al doilea eveniment de endosimbioză, în amoeboidul devenit aerob a pătruns un procariot flagelat, modificat prin mutație, de tip **Spirochaeta**, care a devenit ancestorul flagelului, respectiv al cililor celulelor eucariote mobile și prin a cărui modificare a rezultat aparatul mitotic, ceea ce a permis ansamblului, de acum **plurigenomic**, să adopte calea diviziunii celulare prin mitoză, un progres remarcabil în reproducerea celulară. Asociat cu fenomenul de sexualitate, un asemenea aparat fusorial a stat la baza desfășurării unui tip derivat de diviziune mitotică și anume meioza, aceasta asigurând reducerea la jumătate a produșilor de replicare și oferind astfel celulelor rezultate dintr-o asemenea diviziune reducțională, capacitatea de a fuziona, fără a se realiza o mărire exponențială a cantității de material genetic, ceea ce ar fi creat dezechilibre majore în funcționarea normală a celulei. Produșii meiozei au devenit astfel celule reproducătoare (sexuale) sau gameți. Meioza implică însă numeroase mecanisme de rearanjare prin recombinare a seturilor de gene, oferind nelimitate posibilități de diversificare a programelor genetice. Aceasta a condiționat evoluția explozivă a celulelor eucariote, a căror geneză s-a realizat prin asemenea procese de endosimbioză succesivă. Într-adevăr, *Fr. Jacob* consideră în cartea sa „Logica viului“ (1970) că **sexualitatea a reprezentat una dintre cele mai mari invenții ale naturii.**

Din această a doua endosimbioză a rezultat un **amoeboflagelat** care se putea deplasa în mediu, avantaj enorm față de formele imobile, deoarece îi oferă șansa de a găsi noi surse de hrană și de a se feri de prădători – organisme heterotrofe, incapabile de a-și sintetiza substanța organică de care au nevoie, fiind obligate s-o preia prin prădarea altor organisme. Relațiile trofice au constituit un element major al evoluției lumii vii.

Amoeboflagelatele au evoluat prin mutație, recombinare și selecție direct în protoctiste și fungi și indirect în celule animale și celule vegetale. Pentru geneza celulei vegetale a mai fost necesar încă un eveniment de endosimbioză. Acest al treilea eveniment de endosimbioză a implicat pătrunderea (eventual „înghițirea“) în amoeboflagelatul aerob a unui procariot aerob, capabil de a realiza fotosinteză, adică de a utiliza CO_2 și H_2O în producerea de substanță organică, cu folosirea energiei solare și a hidrogenului din apă, pentru reducerea CO_2. Un asemenea procariot a rămas stabil în celula gazdă, păstrând o relativă autonomie structural-funcțională, dar căzând sub incidența mecanismelor de control ale celulei gazdă. El a devenit cloroplast și astfel, celula gazdă a devenit o celulă vegetală, capabilă de fotosinteză în condiții aerobe.

Cel mai probabil candidat pentru această a treia endosimbioză, și deci pentru strămoșul cloroplastului celulei vegetale, este considerat procariotul **Prochloron**, încadrat printre cianobacterii, deși are cele mai multe trăsături bacteriene fotosintetizatoare. Posibilitatea unui asemenea scenariu de geneză a cloroplastului celulei vegetale este argumentată, pe lângă multe date de biologie moleculară comparativă a cloroplastelor, și de existența unor simbioze de tip special dintre o celulă lipsită de cloroplaste, aparținând unor grupe de protoctiste, cu statut taxonomic incert, care găzduiește o celulă cianobacteriană numită **cyanella** (fig. 2), capabilă de fotosinteză, ceea ce face ca asemenea asociație de celule să fie autotrofă. Una dintre aceste asociații actuale se numește *Cyanophora paradoxa*, iar alta *Glaucocystis nostochinearum*. Încercarea de separare a cianelelor de gazdă și de creștere izolată a cianelelor, pe mediu de cultură specific cianobacteriilor a eșuat, de unde s-a dedus că această endosimbioză este constituită de multă vreme și între parteneri s-au stabilit relații complexe de interdependență structural-funcțională, necunoscute de către oamenii de știință și, ca urmare, imposibil de reprodus în culturi de laborator.

Un asemenea scenariu al genezei celulei eucariote se bazează pe mai multe date privitoare la biologia mitocondriilor și cloroplastelor celulei eucariote actuale. Analiza moleculară a ADN mitocondrial și a ADN cloroplastic precum și datele referitoare la reproducerea acestor organite, bazate pe analiza electronomicroscopică, atestă asemănările indubitabile dintre aceste organite și celulele procariote. ADN mitocondrial este un duplex circular, dublu catenar, remarcabil de asemănător cu cromozomul bacterian, fiind, ca și acesta, necomplexat cu histone. Același lucru se poate spune despre ADN cloroplastic.

Aspectul ultrastructural al zonelor din mitocondrie și cloroplast, în care se află adăpostit ADN este asemănător cu imaginea electronomicroscopică a nucleoidului bacterian sau cianobacterian (fig. 3).

Diviziunea mitocondriilor și a cloroplastelor se realizează după modelul sciziparității, prin constricție mediană (fig. 4) asemănător diviziuni celulei bacteriene.

Toate aceste caracteristici denotă înrudirea indubitabilă a organitelor celulei eucariote (în speță mitocondriile și cloroplastele) și constituie argumente, e drept indirecte, în sprijinul ipotezei originii celulei eucariote, prin endosimbioze succesive.

Această ipoteză oferă o explicație plauzibilă pentru originea organitelor celulei eucariote. Ea nu arată însă cum a avut loc saltul evolutiv remarcabil în geneza organizării nucleului celulei eucariote, cu repartizarea informației ereditare pe mai mulți genofori nucleari (cromozomi eucariotici) și

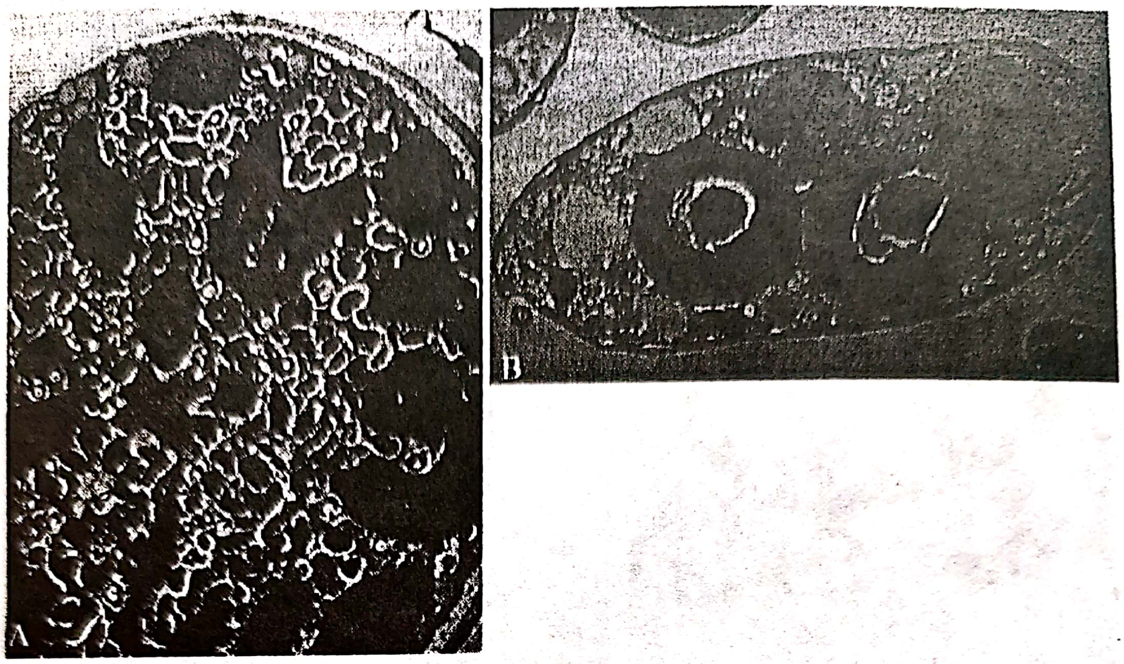


Fig. 2 — Electronomicrografia unei alge verzi eucariote (Clorophyta) lipsită de cloroplaste de tip normal, întâlnite la algele verzi, dar care realizează fotosinteza cu ajutorul unor organite asemănătoare cianobacteriilor și care au formă ovală (x 7.000, după Patrick Echlin, din J. Kimball, 1994); B. Cianele din protozoarul *Cyanophora paradoxa*. Aceste cianele seamănă întrutotul cu cianobacteriile (după Lynn-Margulis, 1971).

închiderea acestora într-un spațiu genetic (spațiu nuclear) delimitat față de citoplasmă printr-o anvelopă nucleară, derivat al reticulului endoplasmic.

Datele privitoare la rolul membranelor intracitoplasmatice în compartimentalizarea citoplasmei celulei eucariote sunt importante, sugerând „împrejmuirea“ materialului genetic nuclear, dar nu și celelalte aspecte legate de organizarea în sine a materialului genetic nuclear. Din acest punct de vedere, se pare că diferențierea genelor pentru histone a reprezentat un moment crucial în geneza organizării cromozomului eucariotic. Evident, asemenea gene nu puteau veni din neant, ele având precursori la procariote, încă neidentificați. Referitor la distribuția informației genetice nucleare în mai mulți cromozomi, studiile efectuate la grupe inferioare de microorganisme eucariote, incluzând grupul dinoflagelatelor și al altor protoctiste poate aduce unele clarificări, iar datele noastre (Gavrilă L., Gavrilă L.B., Gavrilă V.R. și alții, în acest volum) referitoare la mutageneza la cianobacterii pot aduce unele explicații asupra modului în care materialul genetic replicat poate rămâne într-o aceeași celulă.

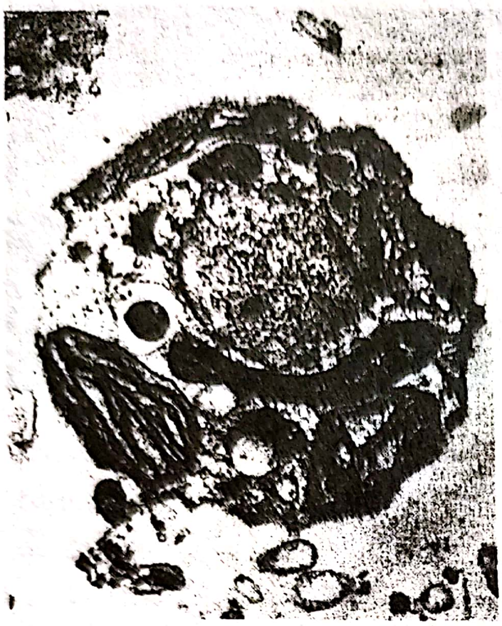


Fig. 3A — Ultrastructura celulei de *Dunaliella salina* prezentând mai multe profile de cloroplast precum și secțiunea longitudinală prin unica mitocondrie aflată în imediata vecinătate a nucleului. La nivelul cloroplastului și mitocondriei apar zone fibrilare cu aspect similar structurii fine a nucleoidului bacterian, și reprezentând zone cu ADN cloroplastic, respectiv mitocondrial. (x15.000, original Gavrilă și Vladimirescu, 2000)

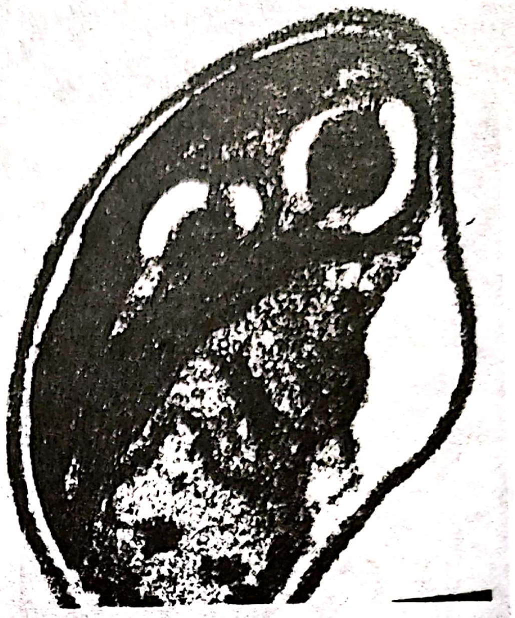


Fig. 3B — Imaginea electronomicroscopică a unei celule de *Dunaliella salina* în care apare nucleul cu profile de cromozomi și membrană nucleară asociată cu blocuri heterocromatice, apartul Golgi și un cloroplast mare cu o zonă fibrilară în stroma acestuia, posibilă regiune cu ADN cloroplastic (x38.000, original Vladimirescu și Gavrilă, 2000)

Prin repetarea unei asemenea desincronizări între replicarea materialului genetic și diviziunea citoplasmei se pot atinge nivele cantitative remarcabile ale acestuia. Procesul poate fi urmat de acumulare de diferențe prin mutație, transpoziție, recombinare și flux genic pe orizontală și în final de reconstituire de subunități structural-funcționale ale unei asemenea cantități de material genetic, inițial uniform, cu individualizarea de genofori separați – cromozomii nucleari ai celulei eucariote. Acesta este un scenariu pe care îl avansăm pentru prima dată. Nu este exclus ca formele la care s-au petrecut asemenea evenimente să fi „dispărut" în pluralitatea tipurilor de organizare nucleară, întâlnite la microorganismele eucariote actuale. Singurele viețuitoare unicelulare care nu s-au angajat într-un asemenea proces al tranziției de la

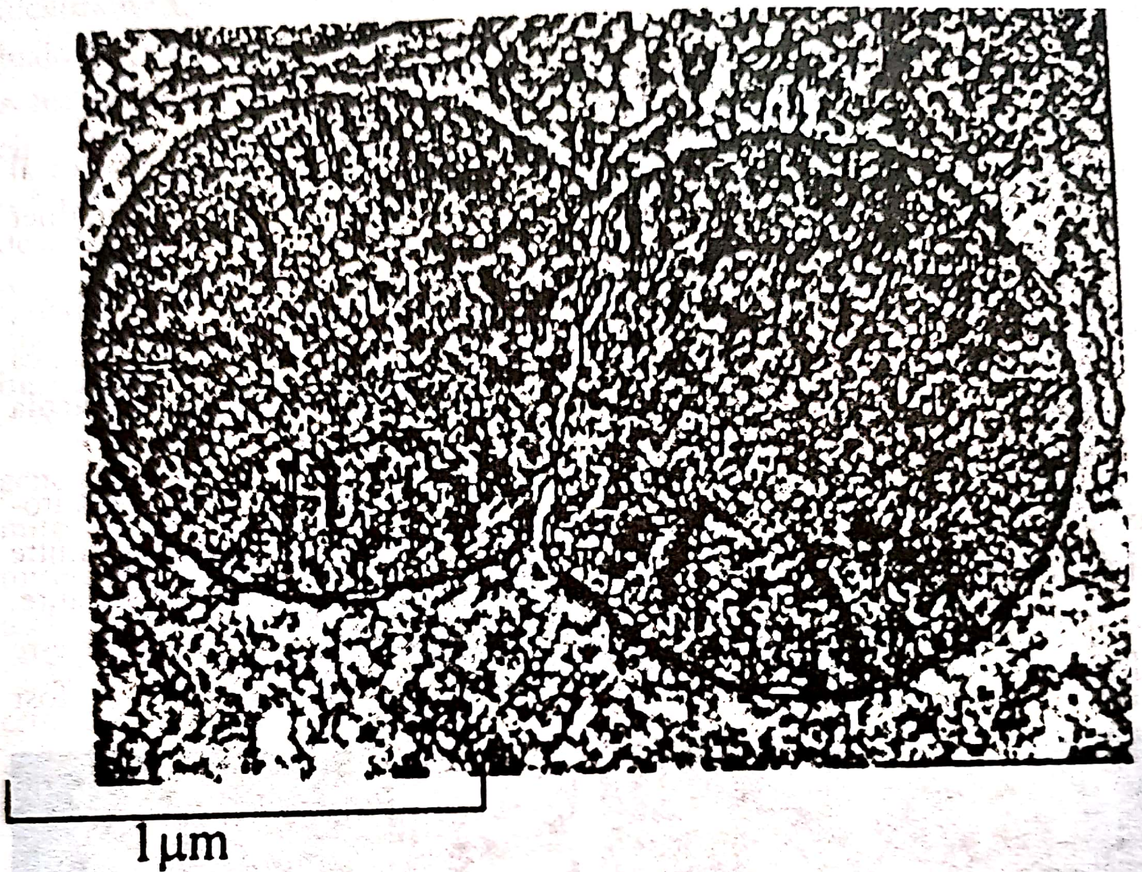


Fig. 4 — Imaginea electronomicroscopică a unei mitocondrii din hepatocite, care se divide după modelul bacterian al construcției mediane (după Daniel S. Friend).

procariote la eucariote au rămas dinoflagelatele, martori vii ai frământărilor nașterii eucariotelor, de acum 1,8 miliarde de ani. Studiul lor, precum și al altor grupe de microorganisme eucariote devine o provocare pentru cei care doresc să-și aducă o contribuție în elucidarea acestui moment crucial în evoluția vieții pe Pământ.

3. GENOMUL MITOCONDRIAL

3.1. ORGANIZAREA GENOMULUI MITOCONDRIAL

Genomul mitocondrial este reprezentat de ADN mitocondrial (ADNmt) identificat pentru prima dată în mitocondrii de către Kolodner și Tewari, în anul 1972.

Cele mai multe genomuri mitocondriale sunt molecule dublucatenare, circulare, covalent închise, superhelicale de ADN, de tip procariot, adică necomplexate cu proteine histonice. În mitocondriile de **Euglena terricola** au fost identificate numeroase regiuni cu ADN (fig. 5).

Toate celulele eucariote prezintă mitocondrii. Deși funcțiile mitocondriilor sunt aceleași, la toate celulele eucariote, s-au identificat multe diferențe în secvența de nucleotide a ADNmt, la diferite specii. La plante, apar diferențe chiar între indivizii aceleiași specii, în ceea ce privește dimensiunea ADNmt. În mitocondriile celulelor vegetale au fost

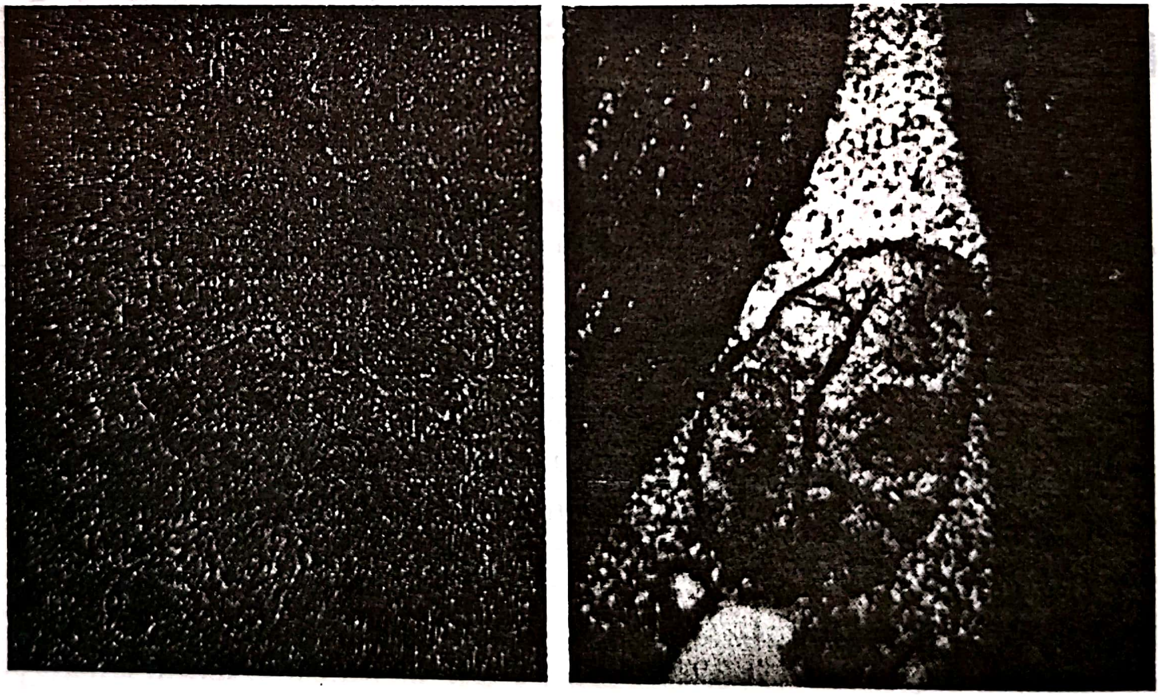


Fig. 5. A — Moleculă circulară de ADN mitocondrial dintr-o celulă umană. Nodul negru asociat acesteia este o proteină implicată în ancorarea ADN la membrana mitocondrială (după J. D. Griffith, din Suzuki și colab., 1981); B. Mitocondrie de *Euglena terricola*, vizualizată electronomicroscopic, în care se pot distinge mai multe structuri fibrilare atașate la membrana mitocondrială (original, L. Gavrilă).

identificate atât molecule circulare, cât și molecule liniare de ADNmt. Forma majoră *in vivo* a genomurilor mitocondriale de la plantele superioare este aceea de molecule lineare de ADN. La plantele de cultură, moleculele circulare de ADNmt sunt mult mai comune decât cele lineare, dar cele mai multe asemenea structuri circulare apar ca piese subgenomice variabile de la 6 Kb, la câteva sute de Kb, fiind derivate ale genomului mitocondrial principal integral, din situsuri de recombinare, definite ca mici repetiții de nucleotide de lungimi diferite, așa cum s-a identificat la **Oenothera berteriana**. La fungi și protozoare, moleculele de ADNmt sunt lineare.

Dimensiunea genomurilor mitocondriale este foarte variabilă. La animale, genomul mitocondrial este relativ mic, de obicei sub 20 Kb, genomul mitocondrial al drojdiilor are aproximativ 80 Kb, pe când genomul mitocondrial al celulelelor vegetale este mult mai variabil, ca dimensiune, de la câteve sute, la câteva mii de kilobaze.

Caracteristica comună a ADNmt, pe lângă necomplexarea sa cu histonele, este absența metilării. În genomurile mitocondriale mari, o mare parte din surplusul de ADN este reprezentat de secvențe necodificatoare a căror funcție este necunoscută.

Genomurile mitocondriale ale mamiferelor sunt foarte eficient organizate, cu foarte puține secvențe necodificatoare, neexistând ADN intergenic sau acesta este foarte redus.

Analiza cantitativă a transmiterii, segregării și recombinării genelor mitocondriale este complicată de statutul înalt poliploid al genomului mitocondrial. O celulă haploidă de **Saccharomyces cerevisiae** (drojdia de bere) conține aproximativ 50 de molecule de ADNmt, organizate în 10–30 „nucleoizi", în cadrul unui număr variabil de mitocondrii, per celulă (Tudzynski și Vornberger, 1980).

ADNmt a evoluat mult mai rapid decât ADN nuclear, deoarece rata mutațiilor în genomul mitocondrial este de aproximativ 10 ori mai mare decât aceea din genomul nuclear. Din această cauză, polimorfismul intraspecific mitocondrial este foarte mare, schimbările măsurabile putând apare chiar și pe parcursul a câtorva generații. Această rapiditate a schimbărilor face ca polimorfismul situsului de restricție din mitocondrii să constituie un parametru convenabil și relevant în studiile de genetica populațiilor la plante, animale și om. Așa se face că, genetica transmiterii

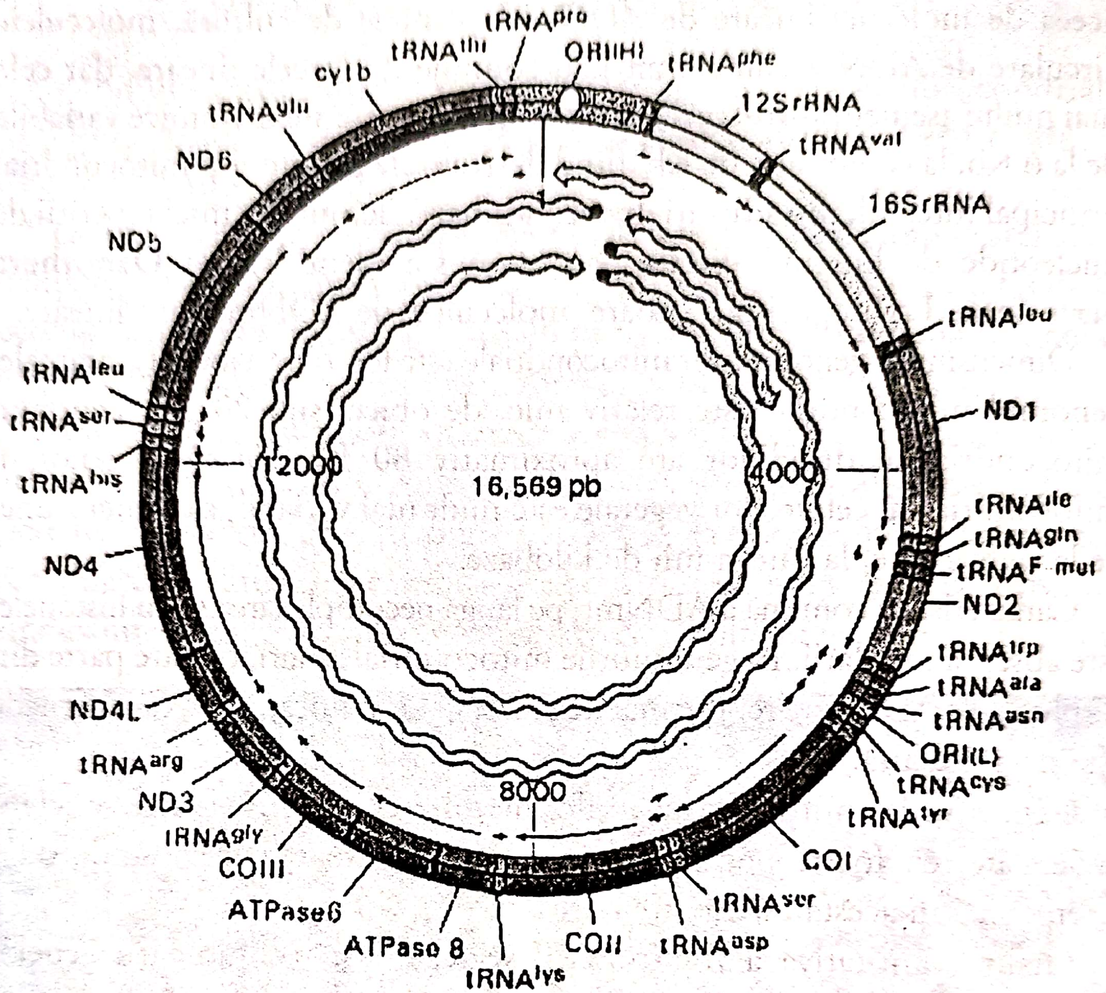

tRNApro
tRNAthr
ORI(H)
tRNAphe
cyt b
12SrRNA
tRNAglu
tRNAval
ND6
16SrRNA
ND5
tRNAleu
tRNAleu
ND1
tRNAser
12000
16,569 pb
4000
tRNAhis
tRNAile
tRNAgln
tRNAF met
ND4
ND2
tRNAtrp
tRNAala
tRNAasn
ND4L
ORI(L)
tRNAcys
tRNAarg
8000
tRNAtyr
ND3
tRNAgly
COI
COIII
tRNAser
ATPase6
ATPase 8
COII
tRNAasp
tRNAlys

Fig. 6 — ADN mitocondrial uman. Sunt redate genele codificatoare de proteine care codifică trei subunități mari ale citocrom C oxidazei (*CO-I, CO-II, CO-III*), citocromul b (*cyt B*), subunitățile 6 și 8 ale complexului ATPazic și subunitățile complexului NADH dehidrogenazei (ND). Sunt redate, de asemenea, genele pentru diferite tipuri de ARNr și pentru ARNt. Cercurile negre arată localizarea aproximativă a situsurilor de start al transcripției, pe cele două catene ale ADNmt: două ARN-uri sunt transcrise de pe catena H (în sensul acelor de ceasornic), cel scurt fiind sursa majoră a ARNr, cel lung fiind sursă pentru ARNm-uri și cele mai multe ARNt-uri. Pe catena L se sintetizează un singur transcript, pe toată lungimea acesteia. Un ARN 7S este transcris în direcție opusă acelor de ceasornic, foarte apropiat situsului de inițiere și aceasta poate juca rol în reglarea transcripției și în maturarea ARNm. Regiunile punctate sunt originile replicării ADNmt. Săgețile mici indică direcția de la 5' la 3' a catenei sens, pentru diferite gene (din Singer și Berg, 1991).

genelor mitocondriale devine astfel o problemă a Geneticii populaționale, la nivel intracelular.

La mai multe specii de mamifere, la **Saccharomyces cerevisiae**, la unele specii de plante și la **Drosophila melanogaster** și **Xenopus laevis** a fost stabilită secvența integrală de nucleotide din ADNmt.

Asemenea analize au evidențiat pattern-ul comun de organizare a genomului mitocondrial al celulelor eucariote, proporția de similitudine variind de la 20 la 90%, la nivelul diferiților loci genici.

Analiza secvenței de nucleotide, precum și studiile de ultracentrifugare izopicnică și densitatea de plutire evidențiază diferențe în conținutul de GC al celor două catene complementare ale ADNmt. Catena cu un conținut mai mare în G este catena grea, desemnată cu simbolul H (de la **heavy** = greu, în limba engelză), pe când catena complementară, având un conținut mai mare în C, este catena ușoară și este desemnată cu simbolul L (de la **light** = ușor, în limba engleză).

În ADNmt de **S. cerevisiae** distribuția perechilor de baze este heterogenă, unele regiuni fiind bogate în AT, având un conținut GC sub 5%. Aproximativ 50% din genomul mitocondrial sunt reprezentate de spațiatori. Există clusteri GC care pot reprezenta situsuri preferențiale de apariție a mutațiilor spontane **rho**$^{-}$. ADNmt de la drojdii a devenit unul dintre cele mai studiate și binecunoscute molecule de acid deoxiribonucleic, de la eucariote, datorită sutelor de mutante mitocondriale identificate la acest grup de eucariote inferioare, care au permis realizarea cartării fizice și genetice detaliate a genomului mitocondrial. Chiar și ADNmt al diferitelor tulpini normale de **S. cerevisiae** variază ca dimensiune între 70 și 76 Kb, deși ordinea relativă a genelor mitocondriale în acest ADNmt este constantă, astfel că diferențele de lungime se datorează adițiilor sau delețiilor din regiuni specifice necodificatoare ale genomului mitocondrial. În unele cazuri, chiar la nivelul regiunilor codificatoare, apar unele variații ale secvenței de nucleotide dar care nu afectează funcția normală a genelor mitocondriale (Morinoto și Rabinowitz, 1979).

Genomul mitocondrial al drojdiei de bere (**S. cerevisiae**) are aproximativ 80.000 perechi de nucleotide, dar numai 1/3 codifică pentru poteine, ceea ce face ca numărul de gene funcționale să fie același ca și în ADNmt uman care are doar 16.569 de perechi de nucleotide (fig. 6). Aceasta înseamnă că cea mai mare parte a ADNmt de la drojdia de bere este necodificator, fiind un așa numit balast genetic (**junk DNA**). Cea mai mare parte a ADNmt la drojdii este reprezentat de segmente spațiatoare lungi, bogate în AT (conținut GC sub 5%) a căror funcție este necunoscută, precum și de secvențe interpuse, care întrerup secvențele codificatoare, ceea ce nu se întâlnește în genomul mitocondrial de la mamifere, incluzând omul.

La **S. cerevisiae**, regiunile bogate în AT acoperă aproximativ 50% din genom, existând și două tipuri de clusteri: clusteri cu conținut GC 45%-60% de G și C, reprezentând 10% din genom și clusteri AT care reprezintă 90% din genom. Bernardi și colaboratorii (1976) au propus un model de organizare a ADNmt la această drojdie, în care apare o alternanță regulată de clusteri GC, gene și spațiatori.

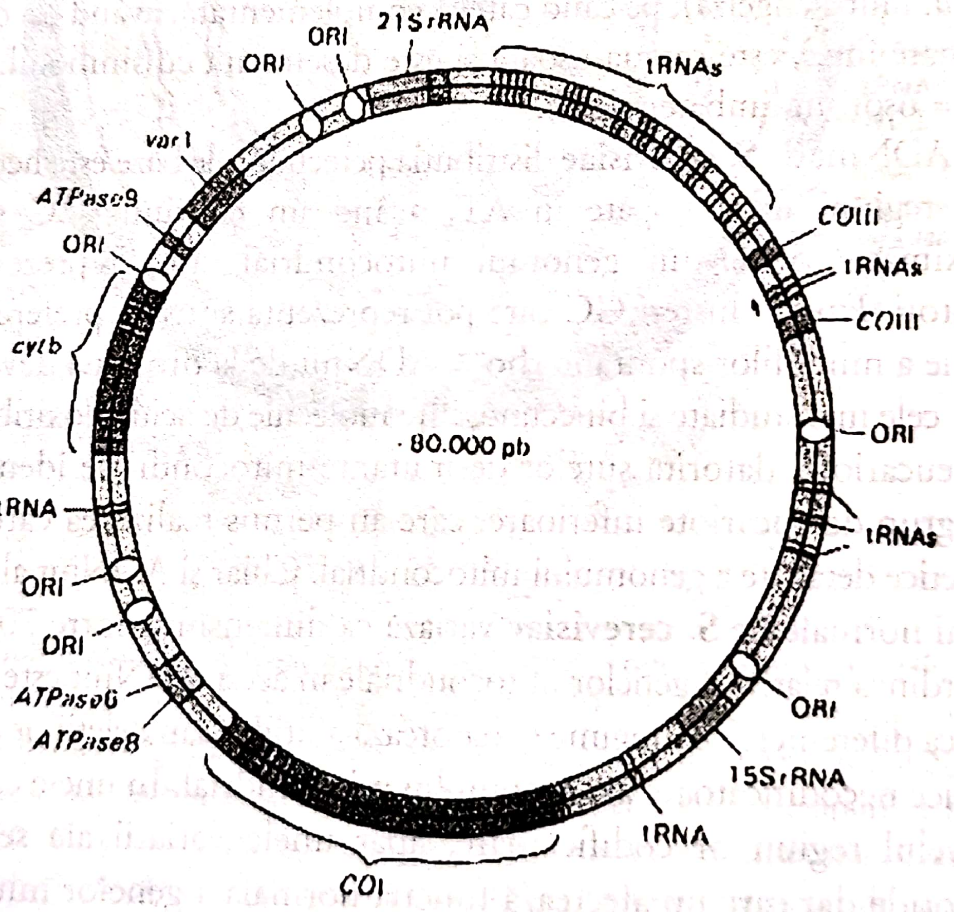


Fig. 7 — Unele caracteristici ale ADN mitocondrial de la drojdia de bere (*Saccharomyces cerevisiae*) care codifică proteine ARNt și ARNr. Secvențele interpuse sunt redate punctat, unele dintre ele conținând cadre deschise citirii (ORF – *open reading frames*). Unele dintre regiunile ADNmt nu sunt caracterizate, dintre care unele conțin origini de replicare (ORI). Transcripția se face în sensul acelor de ceasornic, de la stânga la dreapta, cu excepția genelor pentru ARNt, la nivelul orei 14. (din Singer și Berg, 1991).

În mod convențional, nucleotidul cu numărul 1 este localizat în regiunea originii replicării ADNmt, această regiune fiind importantă și în reglarea expresiei genice mitocondriale (fig. 6). Mergând în sensul rotirii acelor de ceasornic, prima genă întâlnită în ADNmt uman este gena pentru ARNt pentru fenilalanină (ARN_t^{Phe}), urmată îndeaproape de gena pentru ARNr 12S, aceasta fiind ARNr caracteristic subunității ribozomale mici a ribozomilor mitocondriali, a căror constantă de sedimentare este de 60S. Acești ribozomi mitocondriali sunt de tip procariot, dar ei sunt mai mici chiar decât cei bacterieni, din care cauză s-au mai numit **miniribozomi**. Între cele mai multe regiuni codificatoare de ARNr sau de proteine se află una sau mai multe gene pentru ARNt. Spațiile dintre gene sunt mai scurte de 25 perechi de nucleotide lungime, cele mai multe fiind chiar sub 3 perechi de nucleotide. În cazul genelor pentru ARN_t^{Ile} și ARN_t^{Gln} și al genei pentru subunitățile 6 și 8 ale ATPazei, terminalul unei gene se suprapune cu secvența de început a următoarei gene, ceea ce înseamnă că **fenomenul acoperirii de gene** este prezent și în organizarea genomului mitocondrial, nu numai la genele virale și la genele nucleare.

Cu unele variații mai mari sau mai mici, un asemenea pattern de organizare a genomului mitocondrial este întâlnit la toate eucariotele analizate până în prezent, ceea ce permite să se afirme că el este general. Bine caracterizat este și genomul mitocondrial al drojdiei **Saccharomyces cerevisiae** (fig. 7).

Prin utilizarea cartării de deleție, Wesolowski și Fukuhara (1979) au realizat cartarea genelor pentru ARNt, find analizate 95 mutante mitocondriale (deleții extinse ale genomului mitocondrial de tip „petite“). Tulpinile **„petite“** de **Sacharomyces cerevisiae** sunt mutante citoplasmatice, izolate pentru prima dată de către Ephrusi, în anul 1953. Ele sunt determinate de deleții de până la 99% din ADNmt. Tulipinile normale sau de tip sălbatic sunt desemnate **rho**$^{+}$, iar tipul mutant prin **rho**$^{-}$. Fenotipic, asemenea mutante „**petite**“ prezintă deficiențe în respirația celulară și creștere înceată. Ele prezintă un spectru larg, deoarece delețiile afectează diferite sectoare ale ADNmt, pe când, la mutantele **rho**^{0}, nici nu mai poate fi detectat ADN. Pierderea parțială a ADNmt, la unele mutante „petite“, se asociază adesea cu amplificarea ADNmt rămas, amplificare realizată până ce se atinge lungimea normală a genomului mitocondrial. La unele mutante **rho**$^{-}$ se păstrează foarte puțini markeri genetici sau rămân

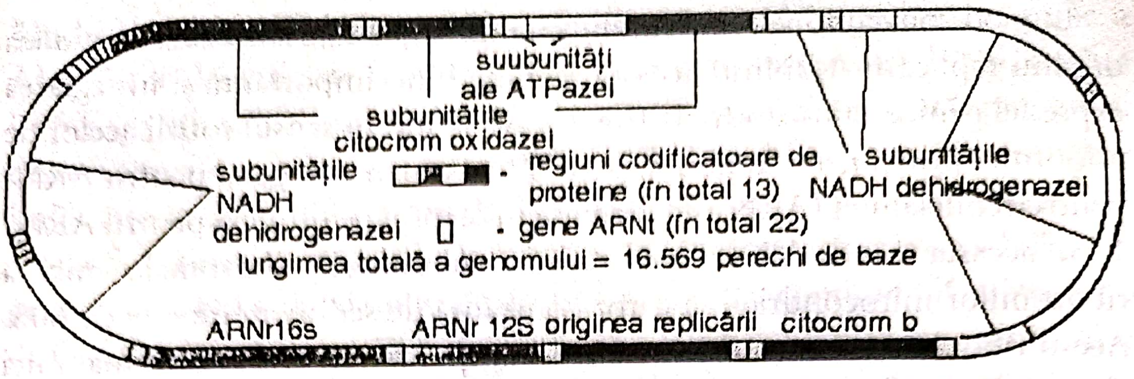

suubunități
ale ATPazei
subunitățile
citocrom oxidazei
subunitățile
NADH
dehidrogenazei
regiuni codificatoare de
proteine (în total 13)
gene ARNt (în total 22)
subunitățile
NADH dehidrogenazei
lungimea totală a genomului = 16.569 perechi de baze
ARNr16s
ARNr 12S
originea replicării
citocrom b

Fig. 8— Organizarea genomului mitocondrial uman. Genomul mitocondrial uman conține două gene ARNr, 22 gene ARNt și 13 secvențe codificatoare de proteine (din Singer și Berg, 1991).

cu un singur asemenea marker. Analizate ultrastructural, se constată că mutantele „petite“, care au pierdut aproape tot ADNmt, nu mai prezintă **criste** mitocondriale. Genotipul **rho⁻** este însă sub controlul genelor nucleare. Moleculele de ADNmt **rho⁻** sunt generate în două etape: în prima etapă sunt excizate anumite sectoare din ADNmt, iar în a doua etapă are loc amplificarea ADNmt rămas, până ce se atinge dimensiunea normală a genomului mitocondrial, având astfel loc o sinteză compensatorie, după modelul inelului rotativ (Locker și colab., 1979). Excizia de sectoare variabile din ADNmt se produce printr-un proces de crossing-over nelegitim, realizat între sectoare parțial omoloage ale aceleiași molecule de ADNmt, în maniera în care are loc excizia profagului lambda din cromozomul bacterian sau disocierea transpozonului de plasmidul gazdă (Bernardi, 1979). Clusterii GC și AT pot reprezenta situsuri preferențiale de excizie, în procesul de geneză a mutantelor spontane **rho⁻**.

Mutantele „petite“ de la **S. cerevisiae** nu pot sintetiza proteine în mitocondriile lor și nici nu pot produce ATP, în asemenea mitocondrii. Mitocondriile acestor mutante au o membrană externă normală, precum și membrana internă, numai că aceasta din urmă prezinte criste foarte puțin dezvoltate sau inexistente. Virtual, toate proteinele mitocondriale la asemenea mutante sunt specificate de gene nucleare și sintetizate în ribozomii din citosol, fiind astfel importate în mitocondrii. Asemenea proteine sunt reprezentate de ADN polimerază, ARN polimerază, toate enzimele ciclului acidului citric (ciclul Krebs) și majoritatea proteinelor membranei interne.

Asemenea mutante **„petite“** au permis să se evidențieze rolul major al nucleului în biogeneza mitocondriilor. Prin analiza lor, s-a putut constata că un organit care se divide prin fisiune binară se poate replica indefinit în citoplasma celulelor eucariote proliferative, chiar și în absența propriului său genom. Mulți biologi cred că peroxizomii se replică în mod normal, pe această cale, iar cercetările noastre (Gavrilă și Chaudhary, 1996), efectuate la dinoflagelate și euglenoficee, sugerează un același proces pentru dictiozomi (aparatul Golgi). Mutantele „petite“ de *S. cerevisiae* pot fi utilizate ca vehicule de clonare sau ca sisteme de amplificare genică. Analiza acestor mutante „petite“ a permis identificarea a 22 de gene pentru ARNt pentru 20 de aminoacizi, două tipuri de ARNt, fiind izoacceptoare. Dintre cele 22 de gene ARNt, 17 sunt grupate pe mai puțin de 20% din genom, restul fiind împrăștiate în diferite locuri din genom. Pentru ARN_t^{Ser} și ARN_t^{Tre} există câte două gene. Unul dintre treonil-ARNt are un anticodon cu care recunoaște codonul leucinei. Astfel se explică de ce unul dintre resturile treonină din proteolipidul ATPazei mitocondriale este codificat de un codon leucină (Welsolowski și Fukuhara, 1979). Secvența de ribonucleotide a fost stabilită și pentru ARNt pentru glicină și ARNt pentru valină (Miller și colab., 1980).

Analiza structurii fine a genelor mitocondriale a fost realizată la genele pentru ARNr 21S, la genele subunităților citocromoxidazei și ATP-ază mitocondriale și genele complexului enzima QH_2-citocrom c-reductază. Au mai fost identificate genele pentru produșii mitocondriali apocitocromul b și proteina var-1, asociată cu subunitatea ribozomală mică, proteină, care joacă rol în asamblarea ribozomilor mitocondriali.

Mitocondriile animale constituie cele mai simple sisteme genetice întâlnite în celula eucariotă multigenomică. În anul 1981, s-a realizat secvențierea completă a ADNmt uman care este de 16.569 nucleotide, realizându-se harta completă a genomului mitocondrial uman (fig. 8). S-a putut astfel constata că, spre deosebire de alte genomuri, în genomul mitocondrial uman, aproape fiecare nucleotid este parte a unei secvențe codificatoare, fie pentru proteine, fie pentru ARNr, fie pentru ARNt, pe când secvențele reglatoare reprezintă o mică parte a acestui genom.

Analizele comparative privind cartarea de restricție a ADNmt au evidențiat variabilitatea ADNmt, de la un țesut la altul al aceluiași organism, precum și între diferitele specii, și chiar între rase diferite, de **Drosophila**.

Spre deosebire de genele mitocondriale de la mamifere, genele mitocondriale de la fungi, drojdii și plante conțin introni ce pot fi îndepărtați din molecule precursoare de ARN, prin procese de **splicing**.

La plante, genomurile mitocondriale sunt mult mai mari decât genomurile mitocondriale din celula animală. Ele sunt totodată mult mai variabile dimensional, între 150 000 și 2,5x10^6 perechi de nucleotide. Astfel, la Cucurbitaceae, genomurile mitocondriale ale unor specii diferă dimensional prin mai mult de 7 ori decât ale altor specii. Și totuși, capacitatea de codificare a acestor genomuri mitocondriale vegetale nu este cu mult peste aceea a genomurilor mitocondriale animale. Numai alga flagelată, unicelulară **Chlamydomonas reinhardtii** are un genom mitocondrial mic de numai 16.000 perechi de nucleotide.

La drojdii s-au descris și așa numiții **„introni opționali"**, deoarece aceștia sunt prezenți într-o genă, la o anumită tulpină, dar lipsesc din aceeași genă, la altă tulpină. Asemenea introni „opționali" par a avea capacitatea de a se mișca dintr-un situs genetic în altul, asemănător elementelor transpozabile. În alte gene mitocondriale, de la **Aspergilus** și **Neurospora**, intronii au poziții corespondente în aceeași genă, analizată la diferite asemenea genuri de fungi. Se presupune că secvențele intronice sunt foarte vechi și, pe când acestea au fost pierdute din eubacterii, ele au fost preferabil păstrate în acele organite ale celulei eucariote în care splicing-ul ARN este reglat, spre a se realiza un control al expresiei genice.

3.2. REPLICAREA ADN MITOCONDRIAL

Celulele de mamifere, aflate în cultură, conțin mii de molecule de ADN mitocondrial. Numărul real al acestora variază de la un organism la altul, fără a fi un număr precis, chiar și într-un tip particular de celulă. Deși replicarea ADN mitocondrial nu este cuplată cu ciclul celular, ea produce suficient de multe molecule noi, spre a asigura ca fiecare celulă-fiică să primescă suficiente mitocondrii.

Cel mai bine înțeleasă este replicația ADNmt de la șoarece. Fiecare catenă a duplexului ADNmt își are propria sa origine de replicare, desemnată Ori-H și, respectiv, Ori-L. În celulele de șoarece, dar nu și la toate animalele, cele mai multe genomuri mitocondriale includ un segment scurt de 550–650 perechi de baze lungime, al catenei H replicată, care constituie așa numita buclă de îndepărtare sau **bucla D.** Asemenea molecule și-au început replicarea mai de timpuriu. (fig. 9)

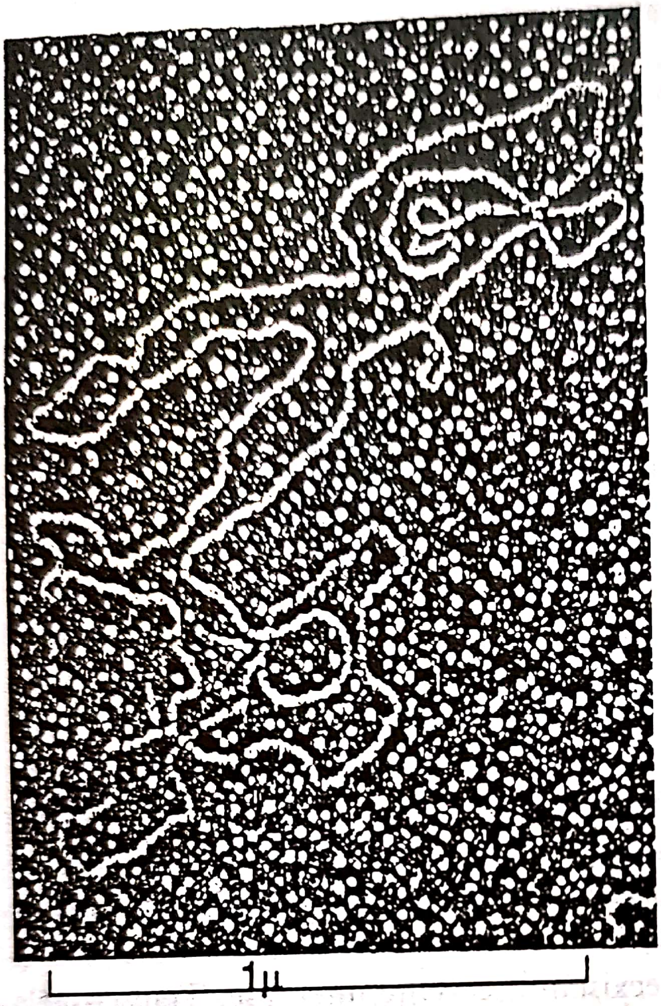


Fig. 9 — Electronomicrografia ADN mitocondrial dintr-o celulă animală aflat în procesul de replicare.

O altă caracteristică neobișnuită a genomurilor mitocondriale mature este prezența împrăștiată a RIBONUCLEOTIDELOR în locul DEOXIRIBONUCLEOTIDELOR. Se presupune că acestea sunt rămășițe ale primerilor ARN utilizați în replicarea ADN mitocondrial și rezultatul inserției de ribonucleotide în cursul alungirii catenei. Nu se știe de ce sinteza ADN mitocondrial este atât de **neortodoxă**, din acest punct de vedere. Spre deosebire de ADNmt al mamiferelor, genomul drojdiilor prezintă șapte sau mai multe origini de replicare, împrăștiate în tot duplexul ADNmt. Fiecare regiune a originii conține trei secvențe scurte bogate în GC, separate de două regiuni lungi care sunt alcătuite aproape exclusiv din AT.

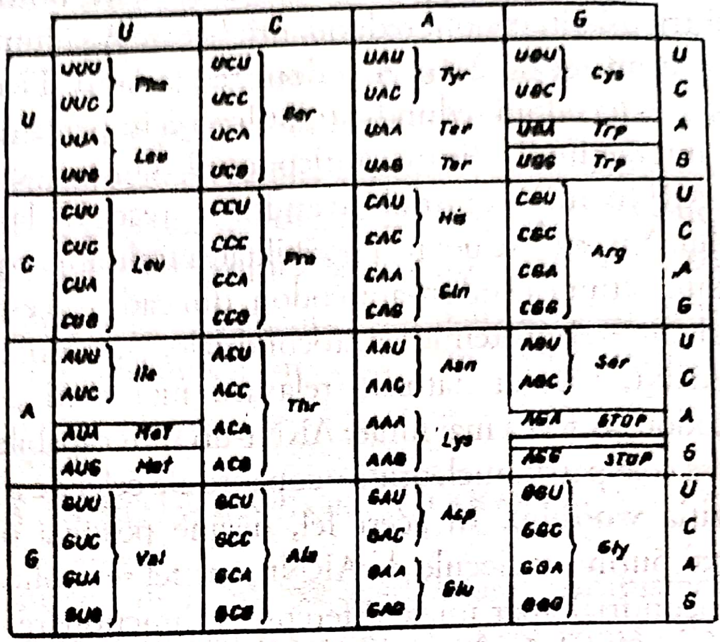
În sinteza ADNmt participă ADNpolimeraza g.

3.3. CODIFICARE ȘI DECODIFICARE ÎN GENOMUL MITOCONDRIAL

Mitocondriile prezintă o parțială autonomie genetică, având un sistem propriu de codificare și de traducere genetică, relativ independent de cel nuclear.

Procesul de transcripție mitocondrială implică existența unei ARN polimeraze celulare speciale denumită ARN polimeraza mitocondrială, dar care este codificată de nucleu. Elementele promotorului sunt conținute în segmente de 40 perechi de nucleotide. Aceste elemente diferă de la o specie la alta de mamifere, după cum și ARN polimerazele mitocondriale prezintă specificitate de specie. În procesarea pre ARNt, spre a deveni ARNt-uri mature, un rol important revine regiunilor flancatoare, întâlnite la aproape toate genele. Sectoarele din transcriptele lungi care reprezintă molecule precursoare de ARNt își asumă structuri pliate, prin realizarea împerecherilor intracatenare, prin punți de hidrogen. Asemenea regiuni pliate sunt recunoscute de RNaze speciale, asemănătoare RNazei P, de la **E. coli**. Acestea clivează de o parte și de alta sectoarele pliate, rezultând molecule individuale de ARNt și ARNr, respectiv precursori ARNm. Din mitocondriile de mamifere a fost izolată o enzimă asemănătoare RNazei P bacteriene. Maturarea moleculelor de ARN desprinse din transcriptul primar se realizează după modelul maturării obișnuite adică, poliadenilare pentru ARNm și adăugarea la terminalul 3' al ARNt a secvenței CCA. Procesul de splicing nu este necesar, neexistând secvențe interpuse. Transcriptele catenei L (de la nivelul unei regiuni de 200 nucleotide de la situsul de inițiere a transcripției) sunt necesare în inițierea replicării la nivelul ori-H, funcționând ca primer.

Aparatul de translație din mitocondriile mamiferelor prezintă unele trăsături neobișnuite. Structura ARNm mitocondrial ridică unele probleme privind desfășurarea traducerii sale, deoarece, pe lângă faptul că este lipsit de boneta de la capătul 5' care se află, fără excepție în toate ARNm nucleare, ARNm mitocondrial nu are nici o secvență lider de lungime semnificativă, secvență aflată în amonte de codonii de inițiere. Astfel, ribozomii mitocondriali trebuie să recunoască și să se atașeze la ARNm mitocondrial într-o manieră neobișnuită, diferită de atașarea ribozomilor citoplasmatici la ARNm de sorginte nucleară. Acest aspect particular al traducerii mesajelor genetice mitocondriale se asociază și cu particularități de codificare mitocondrială, existând un cod genetic mitocondrial (fig. 10) care se abate de la codul genetic universal, în anumite privințe. Astfel, pe lângă codonul



CODUL GENETIC MITOCONDRIAL

	U		C		A		G		
U	UUU	Phe	UCU	Ser	UAU	Tyr	UGU	Cys	U
	UUC		UCC		UAC		UGC		C
	UUA	Leu	UCA		UAA	Ter	UGA	Trp	A
	UUG		UCG		UAG	Ter	UGG	Trp	G
C	CUU	Leu	CCU	Pro	CAU	His	CGU	Arg	U
	CUC		CCC		CAC		CGC		C
	CUA		CCA		CAA	Gln	CGA		A
	CUG		CCG		CAG		CGG		G
A	AUU	Ile	ACU	Thr	AAU	Asn	AGU	Ser	U
	AUC		ACC		AAC		AGC		C
	AUA	Met	ACA		AAA	Lys	AGA	STOP	A
	AUG	Met	ACG		AAG		AGG	STOP	G
G	GUU	Val	GCU	Ala	GAU	Asp	GGU	Gly	U
	GUC		GCC		GAC		GGC		C
	GUA		GCA		GAA	Glu	GGA		A
	GUG		GCG		GAG		GGG		G

Fig. 10 — Codificare genetică în mitocondri.

de inițiere AUG, există alți trei asemenea codoni care codifică tot pentru metionină. Dintre cei trei codoni stop funcționali în codul genetic universal în marcarea sfârșitului mesajului genetic, doar doi au această valoare, în codul genetic mitocondrial, și anume UAA și UAG. Cel de al treilea codon stop din codul genetic universal, UGA, are valoare de codon sens, codificând pentru triptofan, în mitocondrii. În plus, alți doi codoni sens, codificând pentru arginină, în codul genetic nuclear, devin, în codul genetic mitocondrial, codoni stop.

Unele gene mitocondriale sunt lipsite realmnete de codoni stop, respectiv de un sfârșit al regiunii codificatoare. Un exemplu de asemenea genă este gena pentru subunitatea 6 a ATPazei. În asemenea cazuri, procesarea transcriptului primar lasă fie un terminal U, fie un terminal UA și numai procesul de poliadenilare ulterioară a acestui terminal 3' al mesagerului mitocondrial creează un codon stop UAA. Adăugarea prelungirii poli-A, la capătul 3' al transcriptului primar se face posttranscripțional, în mitocondrii, sub acțiunea unei poli-A polimeraze mitocondriale. Abundența moleculelor de ARNr mitocondrial asigură realizarea rezervei necesare de precursori ribozomali.

Spre deosebire de codul genetic universal, care utilizează ARNt-uri separate pentru diferiți codoni redundanți, fiecare ARNt mitocondrial este utilizat pentru un set de 2 sau 4 codoni redundanți. Fiecare ARNt care interacționează cu codoni redundanți, utilizează împerecheri de baze G-U, în cadrul interacțiunii dintre anticodonul său cu codonii cognați, asemenea ARNt mitocondrial având un rest U la capătul 5' al anticodonului. Nu este exclusă nici posibilitatea realizării doar a două perechi de baze în interacțiunea codon-anticodon, din cadrul acestor împerecheri.

În cadrul sintezei proteinice mitocondriale, sunt utilizate doar 22 de tipuri de ARNt, tocmai datorită relaxării mai mari a împerecherilor codon-anticodon, astfel că mai multe ARNt-uri sunt capabile de a recunoaște oricare dintre cele patru nucleotide ocupante ale celei de a treia poziții din codon (poziția **wooble**). În acest fel, devine posibilă o translație care utilizează mai puține molecule de ARNt și astfel se explică de ce în codul genetic mitocondrial apar unele diferențe în funcționarea codonilor, față de codul genetic nuclear. În plus, chiar între diferite specii de organisme se înregistrează diferențe în codificarea mitocondrială. Astfel, codonul UGA este codon pentru triptofan în mitocondriile mamiferelor, incluzând specia umană, precum și în mitocondriile fungilor și protozoarelor, dar reprezintă codon stop, în mitocondriile plantelor. Tot astfel, codonul AGG are valoare de codon stop, în mitocondriile de mamifere și de codon pentru serină, la **Drosophila**. În tabelul 1 sunt prezentate partcularitățile codficării genetice mitocondriale:

Tabel 1. Diferențe între codificarea genetică nucleară și codificarea genetică din mitocondri.

Codonul	Codul genetic universal	Codul genetic mitocondrial*			
		Mamifere	Drosophila	Drojdii	Plante
UGA	STOP	TRP	TRP	TRP	STOP
AUA	Ile	MET	MET	MET	Ile
CUA	Leu	Leu	Leu	THR	Leu
AGA AGG	Arg	STOP	SER	Arg	Arg

* Cu majuscule este trecută valoarea de codificare a codonilor din codul genetic mitocondrial care diferă ca semnificație de codificare de codonii similari din codul genetic universal.

Universalitatea codului genetic este un argument forte al biologiei moderne în sprijinul ipotezei descinderii tuturor celulelor actuale dintr-un strămoş comun. Variaţiile care apar în semnificaţia codonilor din codul genetic mitocondrial sugerează un drift randomic care s-a produs în genomul mitocondrial, în cursul genezei celulei eucariote. Se presupune că numărul neobişnuit de mic de proteine codificate de genomul mitocondrial face ca o schimbare ocazională în semnificaţia de codificare a unui codon rar să fie tolerabilă, pe când dacă o asemenea schimbare ar apare într-un genom mare, ea ar altera funcţia multor proteine şi ar distruge celula.

3.4. EXPRESIA GENELOR MITOCONDRIALE

În genomul mitocondrial au fost evidenţiate mecanisme de reglare specifice. Mutaţiile în regiunea **cob** (complexul coenzimă QH_2-citocrom c-reductază) pot influenţa expresia unui locus care nu este strâns lincat, precum cel al subunităţii I a citocrom-c-oxidazei. Caracterul dual al componentelor mitocondriale este bine dovedită (tabel 2).

Gena citocromului *b* de la **S. cerevisiae** prezintă structură mozaicată (fig. 11) şi precursorul său ARNm este supus splicing-ului, proces în care intervin maturaze. Gena citocromului *b* din genomul mitocondrial uman este lipsită de introni (fig. 12), ceea ce exclude necesitatea intervenţiei prelucrărilor posttranscripţionale.

3.5.MUTAŢII MITOCONDRIALE ŞI EVOLUŢIA GENOMULUI MITOCONDRIAL

Evoluţia genomului mitocondrial ar fi trebuit să fie mult mai rapidă faţă de aceea a genomului nuclear, având în vedere rata de substituţie de nucleotide de 10 ori mai mare din ADNmt, comparativ cu aceea de la nivelul secvenţelor nerepetitive din ADN nuclear (Brown şi colab., 1979). Această rată de mutaţie, atât de mare în genomul mitocondrial, este consecinţa unei fidelităţi mai reduse de replicare a ADNmt sau a unei mai reduse eficienţe a mecanismelor de reparare, dar nu este exclusă contribuţia ambilor factori, în acest proces. Dar erorile de replicare nu au afectat porţiunile

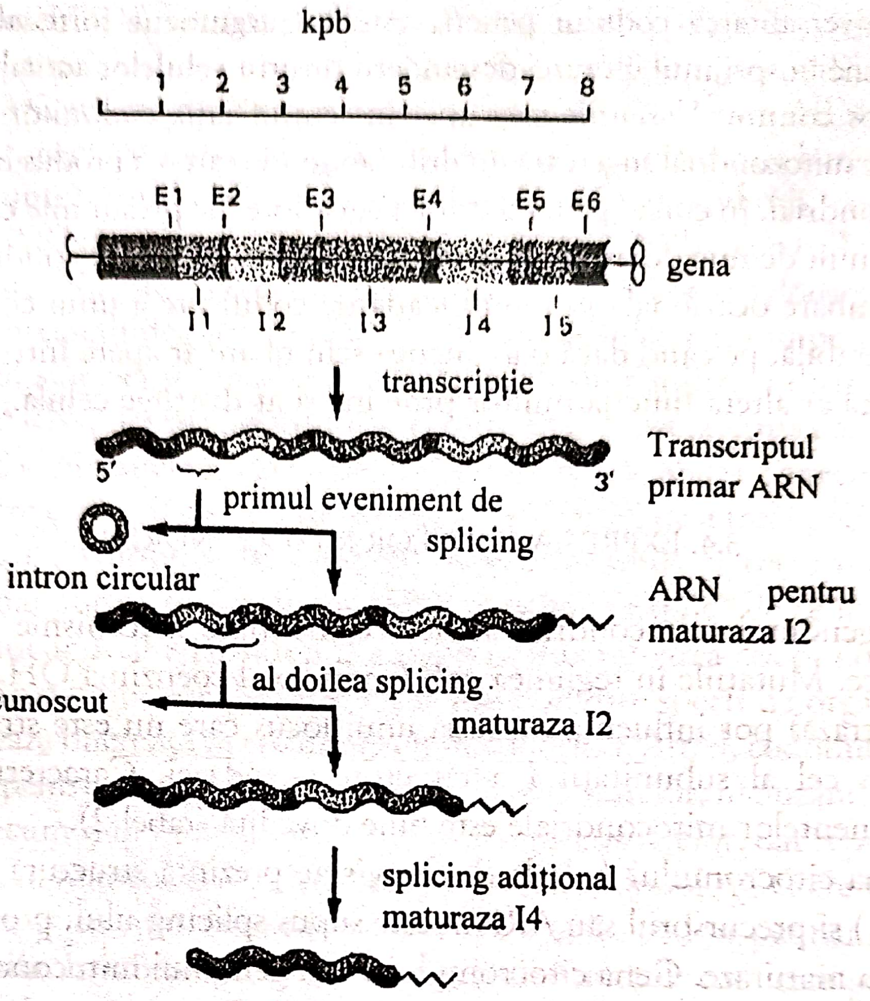

kpb
1
2
3
4
5
6
7
8
E1
E2
E3
E4
E5
E6
gena
I1
I2
I3
I4
I5
transcripție
Transcriptul primar ARN
5'
3'
primul eveniment de splicing
intron circular
ARN pentru maturaza I2
al doilea splicing
necunoscut
maturaza I2
splicing adițional
maturaza I4

Fig. 11 — Gena citocromului b de la drojdie. Regiunile intronice punctate ușor cuprind regiuni codificatoare pentru maturazele 12 și 14.

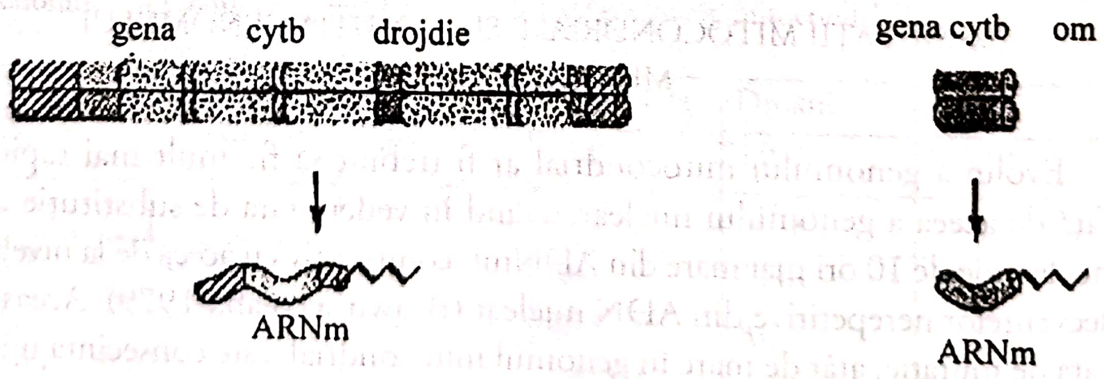

gena cytb drojdie
ARNm
gena cytb om
ARNm

Fig. 12 — Gena citocromului b (*cyt B*) din ADN mitocondrial și ARNm corespunzător, la drojdie și la om. Exonii sunt uniform înnegriți, pe când intronii sunt punctați. (după P. Borst și L. A. Grivell, Nature 290: 443, 1981)

codificatoare ale genelor mitocondriale. Prezența a numai 22 de tipuri de ARNt și dimensiunea neobișnuit de mică a ARNr de sub 2/3 din dimensiunea ARNr de la bacteria **Escherichia coli**, ar putea reduce fidelitatea sintezei proteinice ce are loc în mitocondrie, ceea ce în fapt nu s-a putut dovedi.

Studii comparative asupra secvenței ADNmt bazate și pe rata relativ înaltă de evoluție a genomului mitocondrial au oferit posibilitatea descifrării evenimentelor evolutive relativ recente, precum au fost etapele în evoluția primatelor. Analizându-se secvența de nucleotide din ADNmt din placentă de la diferite rase și populații umane, din Africa, Polinezia, Asia, America și Europa, s-a ajuns la concluzia că în ADNmt prelevat din placentele umane de la femei din Africa se află secvența originală, prototipul sau arhetipul de genom mitocondrial uman, în celelalte populații umane secvența de nucleotide din ADNmt abătându-se de la acest prototip de secvență standard. Pe această bază, s-a dedus că, așa cum s-a probat și prin dovezi paleontologice, centrul umanizării este Africa australă, întreaga omenire putând reprezenta descendența unei singure femei care a trăit acum 3–4 milioane de ani în Africa australă, din care cauză s-a numit „Eva mitocondrială“ (Watson și colab., 1987).

Tabel 2. Determinismul genetic al constituienților mitocondriali.

Nuclear	Mitocondrial
Enzime + factori de replicare	—
ARN polimerază + factori de transcriere	—
Enzime de splicing ARN la drojdii	Maturaze pentru splicing la drojdii
Proteine ribozomale	Proteina ribozomală i (la drojdii)
Aminoacil ARNt sintetaze	ARNt
Factori de translație	ARNr
Subunități ale citocromoxidazei	Subunități ale citocromoxidazei
Subunități ale ATPazei	Subunități ale ATPazei
Subunități ale NADH-dehidrogenaze*	Subunități ale NADH-dehidrogenazei

*Lanțul respirator NADH-dehidrogenază se mai numește complexul I sau NADH-ubiquinonă oxidoreductază.

Din tabel rezultă clar că enzime individuale sunt alcătuite din polipeptide codificate unele de gene nucleare, altele de gene mitocondriale. În plus, expresia unor gene mitocondriale depinde de funcții realizate de produși ai genelor nucleare cum ar fi, de exemplu, procesarea transcriptelor ADNmt spre a da naștere la ARNm funcțional. Interdependența intergenomică este însă diferită de la un organism la altul. Astfel, o genă care este mitocondrială într-un organism, poate fi nucleară, la o altă specie, iar, uneori, pentru o aceeași proteină, există gene funcționale, codificatoare, atât în nucleu, cât și în mitocondrii. O situație asemănătoare se întâlnește în cloroplaste.

Caracteristicile transmise pe linie citoplasmatică prin mitocondrii include rezistența la droguri exprimată de **Kluyveromyces lactis**, tutun, celule de hamster chinezesc și celule umane în cultură, apoi deficiențe respiratorii, unele anomalii morfologice la **Schizophylum communae**, variații ale produșilor de traducere asociate cu sterilitate masculă etc.

3.6. GENOMUL MITOCONDRIAL AL PLANTELOR

Genomul mitocondrial al plantelor se distinge de genomurile mitocondriale de la celelalte eucariote, prin două caracteristici:

1) dimensiune foarte mare și variații extreme chiar între specii îndeaproape înrudite;

2) heterogenitatea structurilor circulare ale ADNmt din celulele vegetale, ceea ce a sugerat chiar și posibilitatea distribuției informației ereditare mitocondriale pe mai mulți genofori, situație care ar aminti de organizarea genomului nuclear.

În tabelul 3 se redă dimensiunea genomului mitocondrial vegetal în megadaltoni (Md), comparativ cu aceea de la alte organisme reprezentative.

Analiza tabelului generează concluzia că cel mai mic genom mitocondrial vegetal este mai mare chiar și față de cel mai mare genom mitocondrial de la toate celelalte eucariote. Speciile de plante strâns înrudite, precum sunt cele ale genului **Brassica** pot prezenta o variabilitate redusă în dimensiunea genomului vegetal, dar există și cazuri de variabilitate mare între specii înrudite, precum este acela al curcubitaceelor, uneori atingând dimensiuni de 7 ori mai mari, la unele specii față de altele.

Tabelul 3. Caracteristicile genomului mitocondrial al plantelor (după Borst și colab., 1984).

Organismul	Dimensiunea genomului (Md)	Produși de traducere*	Gene+
Metazoare	10–11		6+8 URF-uri**
Achlya (fungi)	33		
Drojdii			
Torulopsis glabrata	13		
Brettanomyces custersianus	19		
Sacharomyces cerevisiae	50		10+=8 URF-uri
Brettanomyces custersii	67		
Alge			
Chlamydomonas	10		
Chlorella	53		
Angiosperme			
Zea mays	320	15–20	
Pisum sativum	240	18–20	
Vicia faba	190	15–20	
Brassica juncea	120		
B. campestris	130		
B. oleracea	140		
B. napus	140	circa 20	
Citrullus vulgaris	220	circa 20	
Citrullus (zuchini)	560	circa 20	
Cucumis sativus	1000	circa 20	
Cucumis melo	1600	circa 20	

* număr de benzi polipeptidice pe geluri SDS – poliacril amidice unidimensionale, după încorporarea ^{35}S-metioninei în mitocondrii izolate

** **unassigned reading frame** = cadru de citire fără desemnare.

+ gene codificatoare de proteine.

Explicația pentru dimensiunea mai mare a genomului mitocondrial al plantelor, față de restul eucariotelor, se bazează pe existența unei complexităţi mai mari a acestuia, datorită prezenţei în el de gene suplimentare sau a unor secvenţe adiţionale, cu funcţie sau fără o funcţie anume **(ADN „egoist“ sau „ignorant“).** Deşi nu se bazează pe argumente neechivoce şi este contrazisă de cazul cucurbitaceelor, ipoteza prezenţei unor gene adiţionale în genomul mitocondrial al plantelor are ca suport identificarea genei pentru subunitatea α a F_1-ATPazei ca produs de translaţie în mitocondriile de porumb şi alte specii de angiosperme, incluzând **Vicia faba**.

Există şi afirmaţii potrivit cărora genomul mitocondrial al plantelor conţine un număr aproape dublu de gene, comparativ cu genomul mitocondrial de la fungi şi de la animale. Acest exces de ADNmt de la plante este şi consecinţa frecventelor recombinări şi rearanjamente de secvenţă care conduc la formarea de pseudogene, cu extinderea dimensiunii genomului fără ca aceasta să se asocieze cu dobândirea de funcţii genice operaţionale. De asemenea, în genomul mitocondrial din celulele vegetale pot fi şi secvenţe de ADN nuclear, ceea ce a făcut ca acest genom cloroplastic să fie considerat a fi *„nuclear, plastidic şi mitocondrial“* (Schuster şi Brennicke, 1988).

Nu este exclus ca grosul ADNmt la plante să îndeplinească o funcţie independent de natura secvenţei. Cantitatea de ADN nuclear se corelează în multe cazuri cu un grup de proprietăţi numite generic „nucleotipul“ (Bennett şi colab., 1982). Nucleotipul afectează multe proprietăţi celulare şi organismice, precum volumul nucleului şi al celulei, durata ciclului mitotic, rata dezvoltării, distribuţia ecologică şi geografică (Cavalier-Smith, 1978).

Există nuanţe în interpretarea ADN suplimentar din mitocondriile plantelor. „**ADN selfish**“ (egoist) poate fi dăunător, dar există şi categoria de **ADN „ignorant“**, acesta neconferind nici avantaje, dar nici dezavantaje plantei. Dacă la **Chlamydomonas** şi animale au fost diferenţiate mecanisme pentru supresia completă a ADN suplimentar, plantele nu au elaborat asemenea mecanisme şi pot tolera excesul de ADNmt care la unele cucurbitacee ajunge să atingă proporţia de 99% din genomul mitocondrial.

La ciuperci, au fost descoperiţi aşa numiţii introni „opţionali“ care nu conferă vreun avantaj, de vreme ce la unele tulpini ale aceleiaşi specii ei există, pe când la alte tulpini sălbatice, asemenea introni „opţionali“ nu există. Prezenţa intronilor „opţionali“ în ADNmt al plantelor poate fi cauza excesului cantitativ în genomul mitocondrial vegetal. Prezenţa intronilor „opţionali“ la **Neurospora crassa** explică variaţia cantitativă mare a genomului mitocondrial de la 60 la 73 kpb (40 – 80 Md), dependent de specificul tulpinei sălbatice analizate. Astfel, gena pentru subunitatea I a citocrom oxidazei (COX I) prezintă, la diferite tulpini, între 0 și 4 introni opționali. Și în gena pentru citocrom b pot exista fie 2, fie 3 introni, depinzând de tulpina considerată. Și la **Aspergillus nidulans**, există 1 – 3 introni opționali. În opinia lui Labousse și Slonimski (1983), bazată pe cercetări de încrucișare între forma sălbatică și tulpini *„petite“* de **S. cerevisiae,** cu obținere de forme cu mai multe combinații de introni în gena citocromului b, variind de la 0 la 5, toți intronii **cob-box** sunt opționali pentru expresia acestei gene. La porumb, nu au fost identificați introni în gena pentru citocromul b sau COX I. Pe de altă parte, gena pentru subunitatea II COX desemnată COX II, la porumb și la ruda sa cea mai apropiată **Teosinte diploperennis**, are introni de 794 perechi de baze, identici ca secvență, pe când la grâu, această genă este întreruptă în aceeași poziție de un intron care conține un insert înrudit cu intronul de la porumb și care îi mărește lungimea de 1,5 ori față de aceea de la porumb. Gena COX II nu are intron la **Oenothera berteriana** și nici la drojdia de bere. Pentru genele mitocondriale ale plantelor nu au mai fost identificați alți introni. Prezența intronilor opționali ar putea explica excesul de ADNmt de la plante, față de alte eucariote, dar aceasta nu este o dovadă peremptorie, ci doar una dintre posibilități.

Descoperirea în ADNmt de la porumb a unor secvențe care prezintă omologie cu secvențe din ADN cloroplastic (ADNcl) oferă o altă explicație pentru excesul de ADNmt la plante. Acest **ADN „itinerant“** din cloroplaste în mitocondrii reprezintă versiuni modificate ale genelor cloroplastice pentru ARNr 16S și pentru subunitatea mare a ribulozobifosfatcarboxilazei.

În anul 1980, pe baza analizelor electronomicroscopice și biochimice, Quetier și Vedel au afirmat că ADNmt al plantelor ar putea fi linear.

Benedich (1984) consideră că probabil ADNmt al plantelor nu este circular, ci acesta ar putea avea formă lineară. În celulele vegetale din cultură, genomul mitocondrial linear se asociază cu moleculele circulare dispuse în șiruri oligomerice, reprezentând doar un subset din întreaga complexitate de secvență.

Cu toate diferențele enorme în dimensiune dintre ADNmt al plantelor și cel al celorlalte eucariote, numărul de produși de traducere este aproximativ același la plante și la celelalte eucariote. Aceasta înseamnă că cea mai mare parte a ADNmt al plantelor se încadrează în categoria ADN **„egoist"** (ADN **„ignorant"**) sau a intronilor opționali și a ADN **„itinerant"**.

3.7. ADN DIN MITOCONDRIILE NEOBIȘNUITE ALE TRIPANOSOMELOR SAU ADN KINETOPLASTIC (ADNK)

Există un ordin de protozoare numit Kinetoplastidae care include familia Trypanosomidae și care cuprinde flagelate parazite la diferite grupe de animale, de la insecte până la om. Aceste flagelate parazite sunt reprezentate de genurile **Crithidia**, **Leishmania** și **Trypanosoma**. Celula acestor flagelate are o singură mitocondrie modificată, de formă ovală sau rotundă, dar de dimensiune neobișnuit de mare, în interiorul căreia se află o structură aparte de forma unui disc în secțiune transversală cu un diametru de 2mm și care s-a numit kinetoplast. Încă din anul 1924, Bresslau și Scremin au arătat că kinetoplastul conține ADN, dar abia în anul 1958, Meyer și colaboratorii, pe de o parte, și, mai apoi, Steinert (1960), pe de

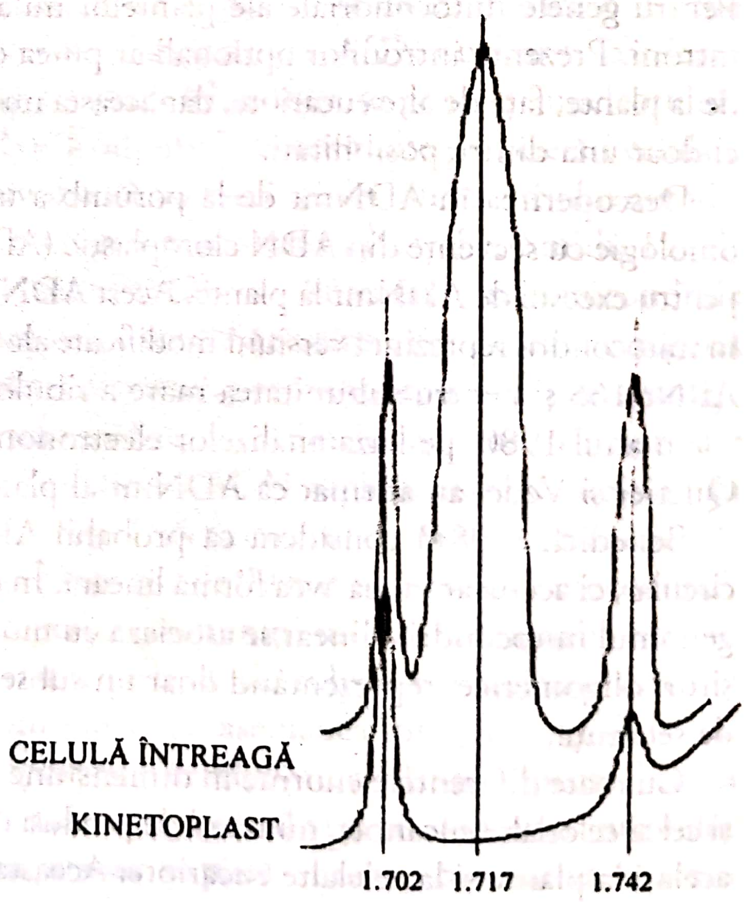


Fig. 13 — Curbele microdensitometrice ale fotografiilor în ultraviolet ale gradienților de densitate de plutire în clorură de cesiu pentru ADN din celule întregi și pentru ADN dintr-o fracție celulară îmbogățită în mitocondrii de la *Crithidia acantocephali*. Banda de referință (ρ= 1,742 g/cm^3) din partea dreaptă reprezintă ADN nativ al bacteriofagului SPO1. Densitatea de plutire a ADN nuclear este de 1,717, pe când aceea a ADN kinetoplastic este de 1,702.

altă parte, au dovedit că acest ADN se află situat într-o regiune anumită a mitocondriei modificate (kinetoplast), aceste cercetări aducând, de fapt, primele dovezi despre existența ADN în mitocondrii.

Acest ADN kinetoplastic reprezintă 20–30% din ADN celular, fiind într-o cantitate de aproximativ 10 ori mai mare decât aceea a ADN mitocondrial din celelalte celule eucariote. El are o densitate de plutire mai mică decât aceea a ADN nuclear al aceluiași organism (fig. 13), deoarece are un conținut GC de 29–51%, față de conținutul de 42–62% GC, pe care îl are ADN nuclear. Studii de ultracentrifugare și de microscopie electronică au dovedit că acest ADN este reprezentat de molecule circulare, covalent închise, de 0,45 mm circumferință, catenane, care cuprind aparent multe asemenea structuri circulare **interlocked**, de 0,45 μm, și unele molecule lineare, lungi. ADN kinetoplastic poate fi evidențiat chiar și cu ajutorul reacției Feulgen sau prin colorare Giemsa și observat la microscopul optic (fig. 14). În secțiuni ultrafine, vizualizate cu ajutorul microscopului electronic, ADN kinetoplastic, desemnat ADNk, poate fi văzut ca o masă omogenă de fibrile de 2,5 nm diametru, situată în porțiunea mai dilatată a mitocondriei modificate. În multe asemenea secțiuni, fibrilele ADN au un aranjament paralel, masa de ADN având dimensiunea de 0,5 mm, la **C. acanthocephali**, și de 0,25 mm, la **T. lewisi**. În secțiune transversală a celulelor, forma generală a ADN kinetoplastic este de disc, cu un diametru de până la 0,2 mm și cuprinzând fibrile scurte, fără vreo orientare particulară, sau poate lua aspectul unor agolmerări fibrilare. In situ, ADNk apare a avea forma unui scurt cilindru, iar fibrele componente apar a fi preferențial orientate paralel cu axa cilindrului. Discurile numite kinetoplaste conțin mii de molecule circulare de ADN.

La **T. brucei** s-au putut identifica 45 de cercuri a căror circumferință corespunde la 21.000 perechi de baze (21 Kb), numindu-se **maxicercuri** și 5.500 de structuri circulare de 1000 perechi de baze (1 Kb), numindu-se **minicercuri**. Maxicercurile au o circumferință de 6–12 mm, pe când circumferința minicercurilor este de 0,2–0,8 mm.

La **T. equiperdum**, aproximativ 90% din ADN kinetoplastic reprezintă minicercuri modificatoare. S-a estimat un număr de aproximativ 10.000 de asemenea minicercuri echivalente ca secvență și reprezentând o lungime echivalentă cu 1 Kb. La **T. brucei** există 300 tipuri variabile de minicercuri. Cele 50 maxicercuri sunt purtătoare de gene funcționale, reprezentând

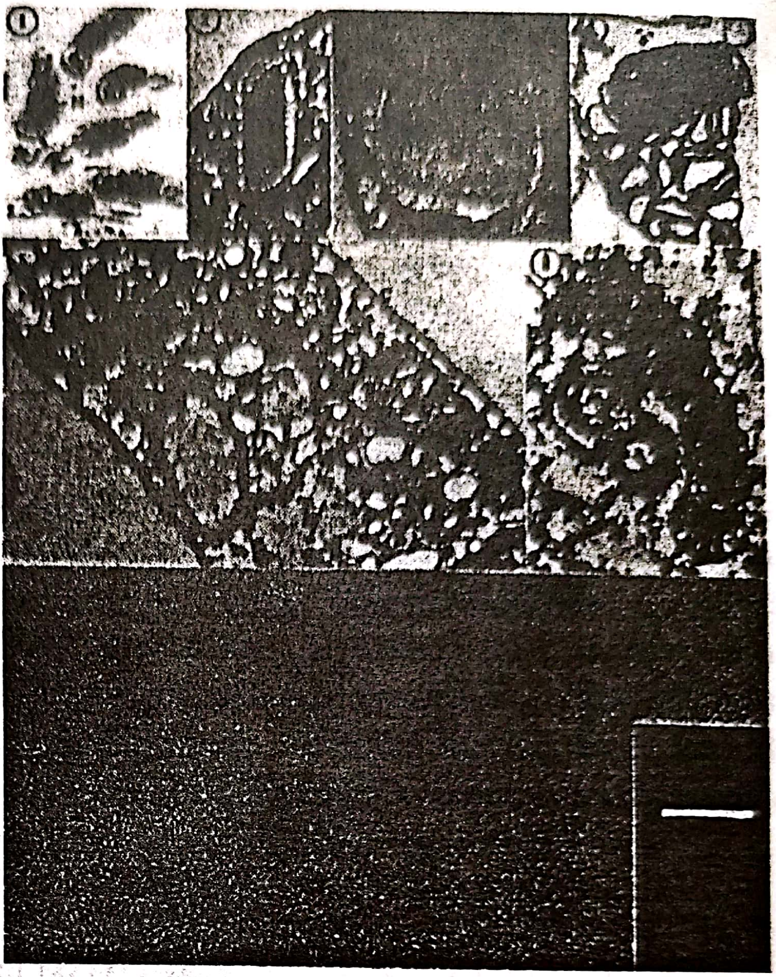


Fig. 14 — Aspectul celular, ultrastructural și molecular al ADN kinetoplastic de la *Crithidia* și *Trypanosoma* [din: „Wolstenholme, D. R., H. C. Renger, J. E. Manning, D. L. Fouths – 1974 – Kinetoplast DNA of Crithidia. The Journal of Protozoology (J. Protozool.), 21(5): 622-631]. **1.** Evidențierea cu ajutorul microscopului optic și colorației Giemsa a nucleului (N) și a kinetoplastului (K) în celulele de *Crithidia acanthocephali*. x 3.000; **2.** Secțiune longitudinală ultrafină prin kinetoplastul de *C. acanthocephali* care apare ca un cilindru în poziție verticală în care se pot vedea numeroase fibrile de ADNk ce prezintă un aranjament paralel. x 22.000; **3.** Secțiune transversală ultrafină prin kinetoplastul de *C. acanthocephali* (K) situat în proximă vecinătate a nucleului celular (N) și în apropierea peretelui celular (C). x 22.000; **4.** ADN kinetoplastic văzut în secțiune printr-o fracție celulară de *C. acanthocephali* îmbogățită în mitocondrii și tratată cu DNază; se păstrează aranjamentul paralel al fibrilelor de ADNk. x 25.000; **5.** Secțiune ultrafină printr-o linie sangvină de *Trypanosoma lewisi* în care se evidențiază ADNk (K) într-o regiune mărită a mitocondriei (M) care se află dispusă de la o margine la alta a celulei, C= perete celular. x 50.000; **6.** Secțiune transversală prin ADNk (K) al unei celule de *T. lewisi* crescută în cultură, în care se vede dispunerea paralelă a fibrilelor de ADN la nivelul kinetoplastului B= corp bazal. x 45.000; **7.** Imagine electronomicroscopică a unei asociații umbrite rotativ cu platină paladiu (după tehnica monostratului proteinic a lui Kleinschmidt) de ADNk de *C. acanthocephali* care cuprinde rozete aparente. Centrul unor rozete este indicat prin săgeți. Se pot observa și buclele unor rozete, spre marginile asociațiilor. Săgeata din partea de sus a imaginii indică o moleculă circulară de aproximativ 0,8µm diametru. x 50.000; **8.** Imaginea în fluorescență a gradientului de densitate de clorură de cesiu a ADN colorat cu bromură de etidium, obținut prin ultracentrifugarea a 150 µg de ADN celular total de *Crithidia acanthocephali*, la 47.000rpm, timp de 44 ore. Se pot vedea clar cele două benzi fluorescente. Microscopia electronică a demonstrat că banda inferioară reprezintă ADN kinetoplastic. X 1,65 (după Renger și Wolstenholme, 1972).

aproximativ 20 Kb. Astfel, la **T. equiperdum**, dimensiunea genomului kinetoplastic este de 21 Kb, pe când la **T. brucei** aceasta are 320 Kb, ceea ce ar însemna diferențe remarcabile în conținutul informațional al unor specii îndeaproape înrudite, care nu se realizează în realitate. Diferențele rezultă din faptul că cea mai mare parte, dacă nu tot surplusul de ADN kinetoplastic, care stă la baza diferențelor enorme dintre specii înrudite, este necodificator.

Moleculele circulare de ADN formează o rețea interlocking, adică ele sunt imbricate în fel și chip (fig. 15) nu prin legături chimice și asemenea molecule circulare închise, imbricate de maniera cercurilor olimpice, se numesc **catenate** sau **catenani**. Modelarea fizică a conformației pe care o pot lua asemenea molecule, precum și produșii rezultați, atunci când asupra lor acționează DNaza pancreatică, se prezintă grafic în figurile 16 și 17. Rețelele izolate de ADNk au un diametru de aproape 10 µm diametru, dar, în interiorul celulei, ele sunt condensate sub forma unui disc de zece ori mai mic. Invariabil, discul este localizat la baza flagelului tripanosomei (corpul bazal sau blefaroplastul).

ADN kinetoplastic este organizat în cea mai mare parte a sa sub forma unor rozete, asociate în grupuri mai mari de câte 35 și în jurul cărora sunt distribuite și rozete simple. Rozetele conțin aproximativ 46 de bucle a căror circumferință are 0,8 µm. Structurile lineare asociate acestor rozete prin legături topologice au peste 0,8 µm lungime. La **C. acantocephali** doar una dintre cele două catene complementare ale ADNk este deținătoarea informației și este transcrisă (catena antisens), informația conținută în ea asigurând sinteza unei catene polipeptidice de aproximativ 30.000 daltoni.

Cu excepția unui segment conservat de câteva sute de perechi de baze lungime, minicercurile din cadrul unei singure rețele variază ca secvență și chiar segmentul conservat nu este în mod necesar același, de la o specie la alta. Toate minicercurile cunoscute au însă în cadrul regiunii conservate, segmentul 5' – GGGGTTGGTGTAA – 3', ceea ce apare a fi o origine de replicare. În plus, în vecinătatea regiunii conservate, minicercurile conțin o regiune de îndoire, de pliere a helixului. Nu se cunoaște ce funcție îndeplinesc minicercurile și nici nu se știe măcar dacă ele conțin secvențe genice codificatoare.

Maxicercurile au o lungime desfășurată de 20–40 Kpb și ele cuprind la speciile analizate o regiune conservată de 17–18 Kpb și o regiune de divergență de secvență care prezintă variații chiar la una și aceeiași specie, ajungând ca la *T. brucei* să aibe nu mai puțin de 1500 pb, după datele lui Simpson și colaboratorii (1985). Secvențele codificatoare sunt dispuse în regiunea conservată a maxicercurilor, alături de regiunea divergentă, în direcția transcrierii aflându-se genele ribozomale la *Trypanosoma* și *Leishmania*. Genele pentru ARNr mic au în jur de 650 pb, pe când cele pentru ARNr mare au în jur de 1500 pb, codificând pentru cele mai mici molecule de ARNr din întreaga lume vie, deoarece ARNr mic are constanta de sedimentare de 9S, pe când ARNr mare are constanta de sedimentare de 12S. Spre deosebire de mamifere, în cazul genomului kinetoplastic este transcrisă mai întâi gena pentru ARNr mic și apoi gena pentru ARNr mare. Există o redusă omologie de secvență între aceste molecule de ARNr din kinetoplaste și moleculele de ARNr de la **E. coli**. Există secvențe omoloage cu sectoare din ARNr 23S de la **E. coli**, implicate în formarea centrului peptidic transferazic al ribozomului.

Datele acestea denotă reducerea genomului kinetoplastic față de cel mitocondrial.

S-a identificat un transcript mic de 240 nucleotide lungime care are transcrisă o parte din regiunea conservată. Acesta, ca de altfel și minicercul în întregimea lui, conține cadre deschise citirii, dar care sunt relativ scurte și de semnificație necunoscută. Maxicercurile reprezintă genomuri mitocondriale funcționale, similare altor genomuri mitocondriale. Spre deosebire de minicercuri, toate maxicercurile dintr-o rețea sunt foarte asemănătoare, dacă nu identice, ca secvență. Asemănător genomului mitocondrial de drojdii, ele sunt foarte bogate în perechi de baze AT, care reprezintă 80% din secvența lor de nucleotide.

În ADN kinetoplastic au fost identificate gene pentru o serie de proteine de tip mitocondrial, precum apocitocromul b, trei subunități ale citocromoxidazei, subunitățile 1, 4 și 5 ale complexului NADH-dehidrogenazei. Nu au fost identificate însă genele pentru subunitățile 6 și 8 ale ATPazei, caracteristice genomurilor mitocondriale, nici la *Trypanosoma brucei*, nici la *Leishmania tarentole*, pe când, la *Crithidia fasciculata*, o tripanosomă mai primitivă, s-a identificat un polipetid, asemănător subunității 8 a ATPazei mitocondriale, sintetizat însă în kinetoplast.

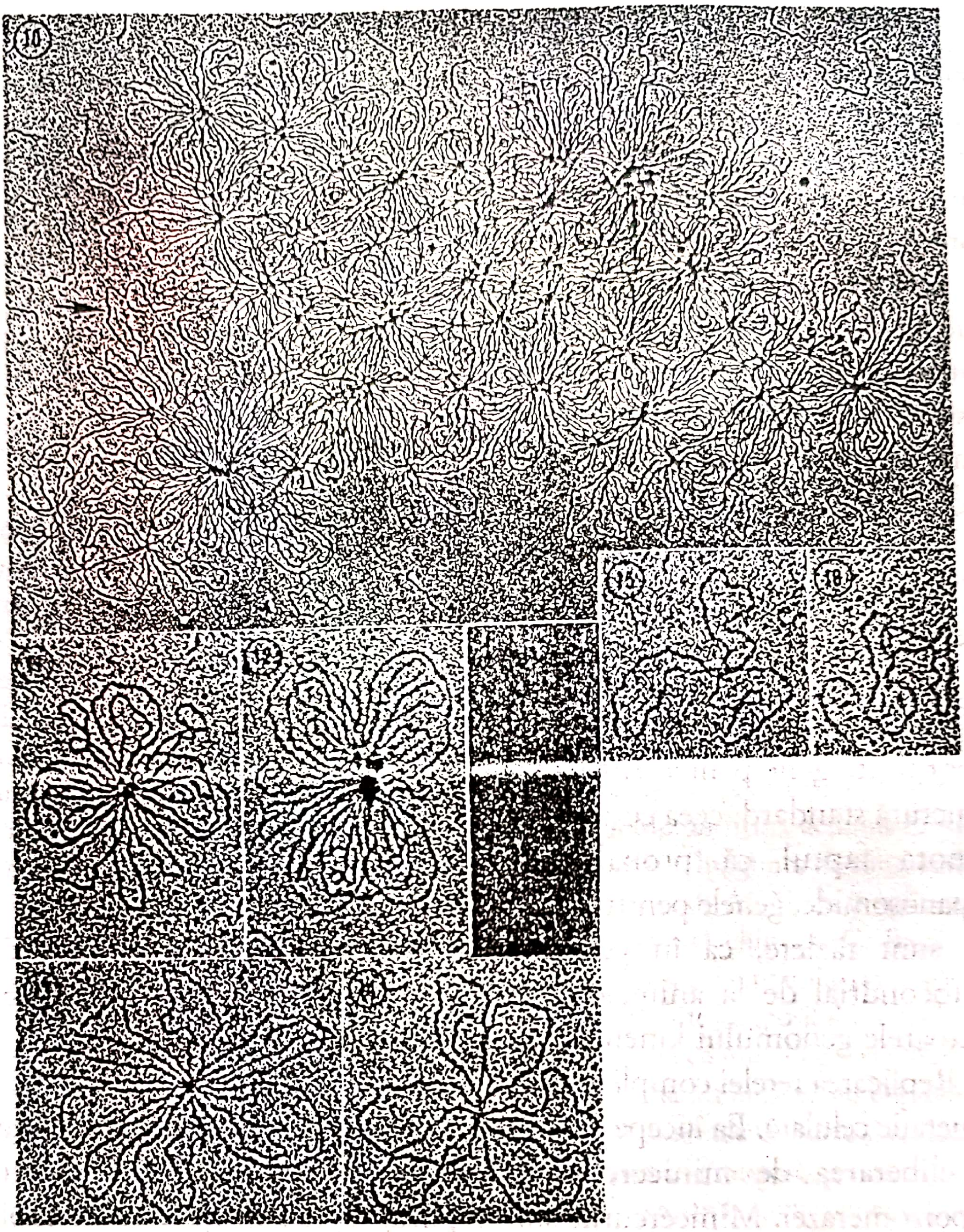


Fig. 15 — Imaginile electronomicroscopice ale fragmentelor de asociație umbrite rotativ și produse prin sonicare, timp de 35 de secunde ale ADN kinetoplastic de *Crithidia acanthocephali*

1. un fragment de ADNk în care se distinge clar rozetele. Săgeata indică două filamente ce cuprind un lanț de 4,08 µm cercuri ce leagă centri a două rozete. O rozetă (I.) are un centru mare, mai difuz din care iradiază numeroase bucle x 50.000;

2-4. rozete unice cu 30, 40 și respectiv 10 bucle (x 68.000; x 78.000 și respectiv x 78.000);

5. o singură rozetă cu 6 bucle, cu lungimea de contur de 0,74 – 0,82 µm (x 78.000) (după Wolstenholme și colab., 1974).

La *T. brucei* și *L. tarentole*, gena pentru subunitatea 2 a citocromoxidazei prezintă două cadre de citire care se suprapun și care sunt omoloage polipeptidelor corespunzătoare de la drojdii și om, în proporție de 26–38%, la nivel nucleotidic. La nivel de secvență de aminoacizi, omologia este mai restrânsă. La aceste două specii au mai fost evidențiate numeroase alte cadre de citire potențiale, dar care nu prezintă omologie cu nici o genă mitocondrială, cunoscută în prezent.

În sectoarele secvențiate ale ADN kinetoplastic nu au fost identificate gene pentru ARNt, cu structură standard, ceea ce ar putea denota faptul că probabil, la tripanosomide, genele pentru ARNt nu sunt răzlețe, ca în genomul mitocondrial de la animale și ciuperci, ci sunt grupate, aflându-se în sectoarele genomului kinetoplastic nedescifrate încă.

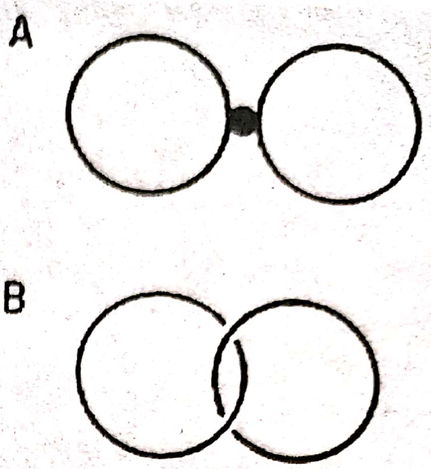


Fig. 16 — Diagrama care ilustrează distincția dintre o legătură chimică și o legătură topologică. Cele două cercuri din A sunt unite printr-o legătură chimică (cercul negru mic dintre cercurile mari). Ruperea acestei legături determină eliberarea celor două cercuri intacte. Cercurile din B sunt unite topologic, adică sunt unite precum zalele unui lanț. Ele se pot roti liber unul față de celălalt, dar nu pot fi separate decât numai dacă unul dintre ele este rupt.

Replicarea rețelei complexe de ADN kinetoplastic are loc odată în fiecare generație celulară. Ea începe cu dezlegarea sau desfacerea structurilor catenate și eliberarea de minicercuri individuale, probabil prin intervenția topoizomerazei. Minicercurile sunt replicate spre a forma cercuri duplexe libere, cu goluri monocatenare care vor fi reatașate la matrix. După aceea, golurile sunt reparate, spre a se forma duplexuri închise. În final, matrixul se divide în două, și cele două rețele segregă în celulele-fiice. Dimpotrivă, maxicercurile rămân atașate la rețea, unde apar a se replica printr-un mecanism de tip inel rotativ. Noile molecule liniare se clivează din inelul rotativ, după care se atașează la rețea sub o formă circulară. Minicercurile ADN kinetoplastic conțin gene funcționale ce sunt implicate în organizarea structurii kinetoplastului, în replicarea macrocercurilor și distribuția acestora

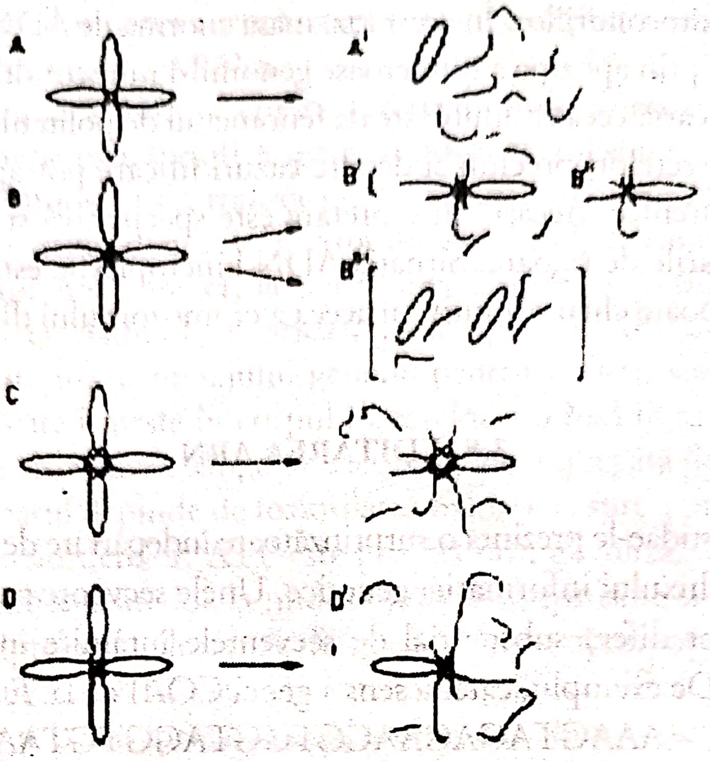


Fig. 17 — Diagrame care explică modalitățile posibile de formare a formelor rozetate ale ADNk (A-D), precum și produșii ce se așteaptă a se obține în urma acțiunii DNazei pancreatice (A'-D'). A. Moleculele circulare de ADN de 0,8 μm lungimea de contur aflate în interlocking topologic (imbricare). B. Moleculele circulare de ADN, cu lungimea de contur de 0,8 μm, unite într-un punct comun, prin legătură chimică. C. Bucle ale moleculelor de ADN de 0,8 μm lungime de contur, ale căror capete sunt unite prin legătură chimică într-un punct comun. D. O moleculă ADN lungă, lineară (posibil și circulară), legată chimic la intervale de 0,8 μm de-a lungul său, la un punct comun. Digestia DNazică, în A, produce molecule circulare solitare (A'). Digestia enzimatică în B, C sau D produce forme moleculare în care apar unite într-un punct comun molecule cu bucle și molecule liniare (B', C' și D' – aspectul real al unei astfel de molecule, la microscopia electronică va fi comparabil celui din B'), precum și molecule liniare de 0,8μm lungime sau mai scurte. Nu sunt eliberate molecule circulare solitare (după Wolstenholme și colab., 1974).

în celulele-fiice. Scenariul replicării ADNk este, desigur, speculativ. Kinetoplastul este o structură particulară , o organizare *sui-generis* a unui genom mitocondrial supus în cursul evoluției unor condiții particulare în care s-a adoptat un fenotip adaptativ și care a rămas ca **„*un accident înghețat*“**. Nu este exclus ca mitocondria enormă a celulei tripanosomidelor, care adăpostește o asemenea structură particulară, să fie, de fapt, rezultatul neseparării mitocondriilor. În acest caz, masa enormă de ADN kinetoplastic este rezultată prin apoziția a numeroase genomuri mitocondriale neseparate în urma replicării, ceea ce amintește de fenomenul de politenie din genomul nuclear al insectelor, precum și de alte cazuri în care pot apare asemenea structuri politenice. Această interpretare este speculativă și ne-o asumăm cu toate riscurile de rigoare. Situația ADN kinetoplastic este comparabilă structural și poate chiar evolutiv cu aceea a cromozomului dinoflagelatelor.

3.8. EDITAREA ARN

Kinetoplastidae-le prezintă o surprinzătoare îndepărtare de la calea virtual universală a fluxului informației genetice. Unele secvențe codificatoare ale maxicercurilor diferă substanțial de secvențele întâlnite în ARNm-urile funcționale. De exemplu, catena sens a genei CO-II de la *T. brucei* include segmentul 5' – AAAGTAGAGAACCTGGTAGGTGTAATGAAATAA – 3', dar secvența corespunzătoare din ARNm CO II, dedusă după secvența ADN complementar (cADN) este: 5' – AAAGUAGA**UU**G**U**A**U**ACCUGGUAGGUGUAAUGAAAUAA – 3'. În fiecare caz, porțiunea ilustrată a cadrului de citire începe cu codonul 5' AAA pentru aminoacidul Lizină. Resturile U redate în bold au fost inserționate în transcriptul primar. Inserțiile (+4) au modificat cadrul de citire, permițând traducerea completă a ARN în polipeptidul CO II. Acest proces de editare a ARN, arată că ADN nu este totdeauna singura sursă de informație codificată. Într-adevăr, s-a dovedit că exprimarea corectă a cinci gene mitocondriale de la Kinetoplastidae, la trei specii ale acestui grup, implică editarea ARN. În afară de schimbarea cadrelor de citire, unele inserții U formează codoni esențiali start (AUG) sau stop (UAA). Într-un caz, cel al genei CO-III, de ***la T. brucei***, peste 50% dintre resturile ARNm reprezintă inserții posttranscripționale de U. În alte kinetoplastide se întâlnesc secvențe codificatoare de ADNmt, omoloage cADN CO-III de *T. brucei*, fără însă să se identifice vreo genă CO-III de *T. brucei*, deficientă în U.

În afară de inserții, editarea ARN poate implica deleții de resturi U, codificate de această genă. În unele cazuri, ARNm funcțional apare a fi produs în mai multe etape, incluzând inserția de multiple resturi U la situsuri date, urmată de eliminarea tuturor acestora, cu excepția acelor resturi U, cerute de funcția finală a ARNm.

Multe aspecte ale acestor reacții de inserție nu sunt cunoscute, incluzând sursa de informație care specifică secvența ARNm corespunzător propriu, sau cum este recunoscut un transcript primar care trebuie să fie editat. O anumită genă necesită editarea transcriptului său ARN, la o anumită specie, dar un transcript ARN intact, la o altă specie. Este probabil ca editarea ARN să fie reglată. Astfel, la *T. brucei*, unele tipuri de ARN, cum ar fi de exemplu cel purtător al mesajului genetic pentru CO-II, sunt editate în forma parazită care trăiește în corpul insectelor, nu însă în aceea întâlnită la mamifere, în eritrocitele sângelui. Aceasta pare a fi legată de faptul că la insecte, protozoarul depinde de fosforilarea oxidativă, spre a produce ATP, dar în sângele mamiferelor, ATP este produs prin glicoliză.

Se pare că editarea are loc la multe tipuri de organisme și nu numai la nivelul transcriptelor nucleare. Astfel, gena pentru apolipoproteina-B de mamifere produce două ARNm-uri, într-unul, un C codificat genomic este convertit într-un U, cu formarea concomitentă a unui codon stop.

De asemenea, două ARNm-uri derivate dintr-o singură genă a virusului Paramyxovirus SV4 diferă prin inserția într-unul dintre ele a două resturi necodificate G. Aparent, editarea ARN nu este restrânsă la inserția și deleția resturilor U, dar nu se știe dacă mecanismele folosite de sistemele mamiferelor sunt înrudite cu cele care operează în Kinetoplastidae. Specificitatea editării ADNk a putut fi explicată numai odată cu descoperirea ARN ghid care reprezintă molecule ribonucleotidice mici, codificate în diferite regiuni ale genomului, capabile de a hibridiza cu o regiune particulară a ARNm ce urmează a fi supusă procesului de editare. Sectoarele neîmperecheate sunt recunoscute de către mecanismele de editare și la nivelul lor se realizează inserții sau excizii de resturi uridină. Complementaritatea dintre transcripte pentru proteine și ARN ghid este explicată prin admiterea că genele pentru ARN ghid reprezintă variante ale genelor duplicate ale genelor destinate editării și rămase ca gene codificatoare de proteine. Cele două mecanisme fundamentale ale prelucrărilor posttranscripționale, ***splicing***-ul și ***editing***-ul ARNm, au multe elemente în comun și nu este exclusă derivarea lor dintr-un același precursor ancestral. Asemănător ***splicing***-ului, ***editing***-ul ARN ar putea să implice reacții de transesterificare mediate de capetele 3'-oligo U, din cozile ARN ghid. Oricum, aceste procese reprezintă „fosile vii“ ale lumii de tranziție de la ARN la ADN, respectiv ale lumii RNP.

Particularitățile genomului kinetoplastidic pot fi prezentate astfel:

1) distribuția relativ compactă a secvențelor de codificare, grupate în regiunea conservativă a ADNk;

2) localizarea genelor pe ambele catene complementare ale ADN, de la nivelul macrocercurilor, dar cu distribuție preferențială pe una dintre ele;

3) lipsa intronilor din gene;

4) dimensiunea minimă a genelor pentru ARNr;

5) aparenta lipsă a genelor pentru ARNt mitocondrial tipic;

6) prezența a numeroase cadre mici de citire.

Tabel 4. Caracteristicile mecanismului de editing la eucariote.

Tipul de *editing*-ARNm	Organismul	Genomul	Transcriptul	Modificarea
Posttranscriere				
Inserție/Deleție	Protozoare Kinetoplastidae *Physarum polycephalum*	Mitocondrie “	ARNm “	U (inserție/deleție) C (inserție)
Conversie	Spermatophyta	“	ARNm ARNr?	C→U, U→C (conversii)
	Anthophyta Mamifere	cloroplaste Nucleu	ARNm ARNm ARNt	C→U (conversii) diferite conversii
	Acanthamoeba castellanii	mitocondrie	ARNt	diferite conversii
Co-transcriere	Paramyxovirusuri	viral	ARNm pentru proteina **p**	inserție G

3.9. STRUCTURI PLASMIDIFORME EXTRANUCLEARE

În structurile eucariotelor au fost identificate structuri asemănătoare plasmidelor, atât în citoplasma celulară, cât și în structura organitelor. Primele structuri **plasmid – like** la eucariote au fost identificate la *Saccharomyces cerevisiae* și descrise sub simbolul **„2µm – DNA“** acesta este un plasmid neesențial pentru celula gazdă, fiind în strânsă legătură cu ADN nuclear și având aceeași densitate de plutire, replicarea sa fiind legată de ciclul celular. În plus, **„2µm – DNA“** apare a avea structură nucleozomală, fiind, în fapt, un minicromozom eucariotic, mult utilizat în realizarea de constructe de clonare.

La *S. cerevisiae* și *Torulopsis glabrata* a mai fost detectat și o structură desemnată **„3µm cccDNA“** care este un plasmid ce hibridizează cu ARN citoplasmatic, reprezentând o copie mobilă a ADNr nuclear (Clark – Walker și Azad, 1980). ADN ribozomal extracromozomal circular a fost detectat și la drojdia *Saccharomyces carlsbergensis* (Meyerink și colab., 1979).

La ciupercile *Fusarium oxysporum* și *Rhizoctonia solani* au fost identificate structuri tip plasmide care se corelează cu fitopatogenicitatea acestor ciuperci (Grimaldi și colab., 1978).

La *Neurospora crassa* s-au identificat plasmide mitocondriale reprezentate de serii monomerice, dimerice sau oligomerice de molecule circulare, bicatenare de ADN. Asemenea molecule circulare de tip plasmidic au fost identificate și în mitocondriile din celulele radiculare ale unor linii de sfeclă de zahăr. Ele au 1,3 – 1,5Kb și sunt prezente ca serii oligomerice care nu hibridizează cu ADNmt. La *Brassica sp.*, în mitocondrii s-a identificat un plasmid linear de 11Kb, dimensiunea sa fiind variabilă în diferite celule, între 1/10 până la 10 ori față de dimensiunea genomului mitocondrial principal.

La unele linii de porumb se întâlnesc plasmide lineare mitocondriale desemnate S_1 și S_2 care hibridizează cu molecula de ADNmt, de unde s-a dedus că ele reprezintă concatemeri derivați în procesul de replicare a plasmidelor (Kemble și Mans, 1983). Asemenea plasmide mitocondriale lineare S_1 și S_2 de la porumb conțin repetiții inversate terminale de 200 perechi de nucleotide și formele lor de replicare ar putea fi concatemerice (Kim, 1982; Kemble și Mans, 1983).

Plasmide circulare mici, asociate cu ADNmt, au fost identificate și în frunzele și cotiledoanele de *Vicia faba* (Nikoferova și Negruk, 1983).

Asemenea structuri circulare mici de ADN au mai fost identificate și în mitocondriile de mazăre, mei și lămâi. Formele ciculare de ADN din mitocondriile de soia au fost grupate în șapte clase dimensionale de la 6 la 30µm.

Se admite că ADN-ul plasmidelor mitocondriale de la plante care nu are omologie de secvență cu ADNmt ar fi de origine nucleară, fiind sechestrat în mitocondrii, perpetuându-se datorită circularizării și capacității sale de autoreplicare.

Molecule circulare mici de ADN au fost descrise și la *Drosophila melanogaster* și sunt implicate în procese reglatoare prin integrare în, și excizie din, ADN cromozomal. O asemenea fracție ccc-ADN hibridizează cu secvențe cromozomale mijlociu repetitive și par a nu fi ADN ribozomal.

În mitocondriile plantelor androsterile de *Zea mays* au fost detectate molecule circulare de ADN, de greutate moleculară joasă, evidențiindu-se o corelație între apariția diferitelor tipuri dimensionale de ADN ccc și diferitele grupe de sterilitate masculă citoplasmatică. La *Podospora anserina* a fost izolată o specie de ADN de tip plasmid care este desemnat **„pl"-ADN** („pl" derivând de la **plasmid-like**) și este asociată cu mitocondriile miceliilor senescente. Senescența la această ciupercă este un proces controlat genetic și implică acțiunea unei particule infecțioase, citoplasmatice (Marcou și alții, 1979). Acest ADN plasmatic este probabil o parte integrantă a ADNmt juvenil și care, devenind liber, induce senescența pe calea infecției citoplasmatice. Acest **„pl"-ADN** este singurul tip de structură ADN *plasmid-like* eucariotic cu o funcție definită în celulă.

În citoplasma și nucleul multor specii de eucariote sunt prezente molecule de ADN sau ARN de natură virală, care interferă cu transmiterea de caractere ereditare.

„Virusul killer" la drojdii constă dintr-un ARN dublu-catenar încapsulat într-un înveliș proteinic și care codifică pentru o toxină ucigașă, letală pentru alte tulpini de drojdii care nu poartă un același virus.

La **Saccharomyces cerevisiae** toxina **killer** este o glico-proteidă. Peste 26 de gene nucleare sunt necesare pentru replicarea și expresia ARN **„killer"**, existând și mutante **„super-killer"**, mult mai eficiente în distrugerea tulpinilor sensibile.

Și la **Ustilago maydis** s-a descris un sistem **„killer"**, comparabil cu acela de la **S. cerevisiae**. El reprezintă un ARN dublu-catenar ce codifică pentru mai multe proteine **killer**.

La *S. cerevisiae* a fost descris și elementul extracromozomal **psi**$^+$, factor autoreplicator care amplifică expresia supresorilor nonsens și menținerea sa este dependentă de activitatea unor gene nucleare. Se pare că acest factor este de natură ADNr extracromozomal.

Tot la *S. cerevisiae* s-a descris un alt determinant extracromozomal nemitocondrial, desemnat **URE3** și care este implicat în modificarea drastică a metabolismului azotului, dar a cărui natură nu este identificată. Și alți determinanți citoplasmatici există la drojdii, dar se cunosc puține lucruri despre ei.

3.10. GENA *T-URF* 13 ȘI RELAȚIA SA CU STERILITATEA MASCUL CITOPLASMATICĂ (SMC)

Sterilitatea mascul citoplasmatică (SMC), cunoscută și sub denumirea de androsterilitatea citoplasmatică, este o particularitate moștenită pe linie maternă care condiționează incapacitatea organismului de a forma gameți masculi fertili. Fenomenul este de mare utilitate în producerea porumbului hibrid – o linie androsterilă scutind realizarea procesului de castrare, atât de costisitor și totodată atât de traumatizant pentru plantă.

Studiile aprofundate au evidențiat relația strânsă dintre genomul nuclear și genomul mitocondrial în condiționarea SMC. La porumbul normal, androfertil, cartarea de restricție a sugerat existența unui genom mitocondrial circular. Pe baza aceleiași analize, s-a sugerat existența unei forme predominant lineare a ADNmt, la porumbul androsteril citoplasmatic (SMC), desemnată forma S (Schardl și colab., 1984). Varietățile de porumb cu sterilitate a polenului, determinată citoplasmatic, sunt cunoscute sub numele de CMS-T, adică cu citoplasmă tip – Texas. Expresia acestui tip de sterilitate a polenului cu determinanți citoplasmatici este controlată de alele diferite ale genelor nucleare dominante Rf-1 și Rf-2, care au acțiune complementară. Dacă aceste două gene se află în stare dominantă, în structura genomului nuclear, determinanții citoplasmatici ai sterilității citoplasmatice (citoplasma Texas sau citoplasmă T) nu se pot exprima fenotipic și nu apare fenomenul SMC. Mutația mitocondrială poate fi supresată de mutații nucleare secundare. Mutații ale unor gene nucleare restaurează fertilitatea acestor plante, existând corespondenți nucleari pentru restaurarea fiecărui tip de androsterilitate citoplasmatică. La formele androsterile, mitocondriile nu funcționează normal, în cursul maturării anterelor, dar asemenea mitocondrii cu genom linear funcționează adecvat în toate celelalte stadii ale dezvoltării porumbului, neevidențiindu-se nici un fel de alte diferențe fenotipice între porumbul normal și liniile cms-S. În plus, plantele cms-S își restaurează fertilitatea cu ajutorul genelor nucleare restauratoare de fertilitate, chiar dacă ele au citoplasmă de tip T și genom mitocondrial linear (Schardl și colab., 1984), de unde s-a dedus că linearizarea ADNmt singură nu este suficientă, spre a cauza sterilitatea citoplasmatică.

Genele pentru androsterilitatea citoplasmatică sunt gene mitocondriale care, totodată, condiționează reacția gazdei la *rasa T* a ciupercii parazite a porumbului *Helminthosporium maydis*. Gena mitocondrială **T-urf13** este responsabilă de sterilitatea citoplasmatică și sensibilitatea plantei gazdă la acest agent patogen. Ea codifică pentru o proteină de 13Kda, desemnată proteina URF-13. Aceasta este o componentă a membranei mitocondriale interne. Introdusă în bacteria *Eschericia coli*, gena a conferit acesteia sensibilitate la fungicide și la metonil. Introdusă în plante de tutun, această genă induce androsterilitate citoplasmatică, la 20% dintre acestea. Analiza plantelor transgenice evidențiază faptul că proteina URF-13 are capacitatea de a forma pori în membrana mitocondrială. În prezența toxinelor, acțiunea sa este amplificată, ceea ce se întâmplă și atunci când plantele de porumb cu citoplasmă T sunt atacate de ciuperca parazită *H. maydis*, această ciupercă producând o toxină specifică.

Mutațiile genelor mitocondriale afectează sistemul respirator, de transfer de electroni, sinteza ATP sau traducerea mesajului mitocondrial, dar nu se știe cum mutațiile genei **T-urf13** pot bloca formarea grăuncioarelor de polen, restul trăsăturilor fenotipice ale plantelor SMC fiind normale.

La porumb cu citoplasma Texas, gena **T-urf13** este o secvență unică care codifică pentru o proteină neesențială în sistemul de transport de electroni. Orice genă mitocondrială poate fi implicată în SMC, dacă apar mutații cu efecte diferite ale funcției mitocondriale, dar acestea au efecte profunde asupra celulelor anterei. Același lucru este întâlnit la om, la care neuropatia optică ereditară Leber, caracterizată prin degenerarea nervului optic și aritmie cardiacă, este atribuită unei mutații punctiforme în subunitatea IV a complexului I mitocondrial. Această mutație afectează doar un anumit țesut, nu însă și alte țesuturi, deși este prezentă în toate celulele.

În cursul dezvoltării polenului, are loc o creștere a numărului de mitocondrii per celulă tapetală, cu 40%, în celulele anterei de porumb, și cu 20%, în celulele sporogene, ceea ce denotă necesitatea pentru o cantitate sporită de energie, în aceste celule. Mutația unei asemenea gene mitocondriale afectează diviziunea mitocondriei, proteina mutantă URF-13 aflându-se în membrana internă mitocondrială și blocând creșterea rapidă a numărului de mitocondrii. Ea poate însă să interfere și cu transferul de electroni sau cu procesele de fosforilare. Nu este exclus, potrivit ipotezei lui Flavell (1974), să existe o substanță specifică anterei în citoplasma tip Texas, la porumb, ce interacționează cu proteina URF-13 și induce permeabilizarea membranei mitocondriale interne, conducând la disfuncția mitocondriilor și moartea celulelor. Substanța specifică anterei are probabil proprietăți similare cu cele ale toxinei ciupercii *H. maydis*. Deși URF-13 este prezentă în toate celulele, acțiunea ei se limitează doar la nivelul celulelor anterelor. Moartea prematură a celulelor anterelor, în special cele ale stratului tapetal, cu rol important în dezvoltarea grăuncioarelor de polen, s-ar putea să interacționeze cu dezvoltarea normală a polenului și să conducă la sterilitate.

Doar în anumite condiții, proteina URF-13 poate afecta variabilitatea și a altor tipuri celulare. Introdusă în bacteria **E. coli**, gena **T-urf13** este exprimată, afectând diviziunea celulelor bacteriene, cu formarea unor celule serpentiniforme, cu viabilitate redusă. Utilizarea baculovirusului pentru transferul genei T-urf13 a permis să se constate natura toxică a proteinei URF-13, la multe insecte.

La porumb, proteina URF-13 traversează membrana internă mitocondrială de 3 ori și terminalul său carboxil este orientat spre matricea mitocondrială. Ea poate exista ca monomer, dimer, trimer etc. Nu se știe însă cu exactitate, în ce mod URF-13 condiționează SMC. Natura sa toxică dă o explicație totuși pentru sterilitatea polenului, la linia de porumb cu citoplasmă tip Texas. Proteina toxică URF-13 poate să influențeze dezvoltarea polenului, omorând celulele anterei, prin permeabilizarea membranelor mitocondriale. Celulele anterei, în special cele din tapetum, devin mai sensibile la proteina toxică URF-13, deoarece în timpul maturării polenului este necesar un număr crescut de mitocondrii, producându-se o amplificare a cantității de URF-13 din aceste celule care, fiind distruse, nu mai pot hrăni granulele de polen în cursul diferențierii acestora și atunci acestea devin sterile.

4. GENOMUL CLOROPLASTIC

4.1. INTRODUCERE

În anul 1909, K. Correns, unul dintre cei trei coredescoperitori ai legilor mendeliene, de la începutul secolului al XX-lea, pe baza unor experiențe de hibridare la **Mirabilis jalapa**, a descoperit, printre altele, că transmiterea anumitor caractere se abate de la legile mendeliene ale eredității, fiind moștenite doar pe linia genitorului matern (matroclin). Astfel, caracterul de variegare a frunzelor se transmite exclusiv de la genitorul matern, chiar dacă genitorul patern prezintă frunze normale, de culoare verde. Correns a explicat acest mod de transmitere pe baza existenței de primordii de cloroplaste în oosferă și a absenței acestora din spermatii. Totodată, el a sugerat existența unor determinanți genetici cu localizare cloroplastică a acestui caracter de variegare a frunzelor, ceea ce a reprezentat prima semnalare a existenței genelor extranucleare, cu localizare în organitele celulei eucariote.

4.2. BIOLOGIA CLOROPLASTELOR

Există deopotrivă similitudini și diferențe structurale între mitocondrii și cloroplaste. La o analiză superficială, cloroplastul seamănă cu o mitocondrie mult lărgită, în care cristele au fost convertite într-o serie de particule submitocondriale interconectate în spațiul matrixului. În cloroplaste se realizează două reacții unice: producerea de ATP și de NADPH, dependentă de lumină, și conversia CO_2 în carbohidrați. În cadrul procesului de fotosinteză au loc multe reacții ce pot fi grupate în două categorii mari: reacții fotosintetice de transport de electroni (*„reacțiile de lumină“*); reacțiile de fixare a carbonului (*„reacții de întuneric“*). În cadrul reacțiilor fotosintetice, energia luminii Soarelui energizează un electron din clorofilă, făcându-l capabil de a se mișca de-a lungul unui lanț de transport de electroni din membrana tilacoidă a cloroplastului, într-un mod foarte asemănător cu mișcarea electronului de-a lungul lanțului respirator din mitocondrie.

Clorofila își procură electronul de la molecula de apă, prin fotoliza acesteia, cu eliberare de O_2. În cursul procesului de transport de electroni, H^+ este pompat de-a lungul membranei tilacoide, rezultând o forță proton-motivată care asigură sinteza de ATP, în stroma cloroplastului. Etapa finală a seriei acestor reacții este reprezentată de încărcarea electronilor împreună cu H^+ pe $NADP^+$ pe care îl convertește în NADPH. Toate aceste reacții sunt desfășurate în cloroplast. În cadrul „reacțiilor de întuneric", ATP și NADPH, produse în cadrul reacțiilor fotosintetice de transport de electroni, sunt utilizate ca sursă de energie și respectiv de putere reducătoare, spre a dirija conversia CO_2 în carbohidrați. Reacțiile de fixare a carbonului, care încep în stroma cloroplastului și continuă în citosol, produc glucoza în frunzele plantelor, de unde este exportată la alte țesuturi, ca sursă de molecule organice și energie pentru creștere.

Astfel, formarea oxigenului (care necesită direct energie luminoasă) și conversia CO_2 în carbohidrați (care necesită doar indirect energie luminoasă) sunt procese separate, dar mecanisme complexe de feedback le interconectează, spre a se stabili un echilibru în procesele biosintetice din celulă. Reacție de „fixare a carbonului" a fost descoperită în anul 1948 și este catalizată în stroma cloroplastului de o enzimă mare, de aproximativ 500.000 daltoni, numită **ribulozobifosfatcarboxilaza** sau **Rubisco**. Pentru fiecare moleculă de CO_2 fixată în ciclul de fixare a carbonului sunt consumate trei molecule de ATP și două molecule de NADPH.

Fotosinteza depinde de fotochimia moleculelor de clorofilă. În centrul de reacție al fotosistemului, energia luminoasă este capturată de către clorofilă, spre a crea un donor puternic de electroni, dintr-unul slab.

La plante și cianobacterii, fotosinteza produce deopotrivă, direct, ATP și NADPH, printr-un proces bistadial numit fosforilare nonciclică.

Cloroplastele pot produce ATP, prin fosforilare ciclică, fără a produce NADPH. Gradientul protonic electrochimic este similar în mitocondrii și cloroplaste. Asemănător membranei interne a mitocondriei, membrana internă a cloroplastului conține proteine cărăuși care facilitează schimbul de metaboliți cu citosolul. În afară de fotosinteză, în cloroplaste au loc multe alte biosinteze, precum cele de acizi grași, aminoacizi etc. realizate în stroma cloroplastelor, apoi reducerea nitritului (NO_2^-) la amoniu (NH_3), oferind plantei sursa de azot necesar pentru sinteza aminoacizilor și bazelor azotate.

În frunzele de spanac, bunăoară, intreaga sinteză de acizi grași are loc în cloroplaste. De asemenea, glicolipidele majore sunt sintetizate în cloroplast.

Spre deosebire de mitocondrii, cloroplastele au membrane interne suplimentare numite tilacoide, precum și un spațiu intern al acestora numit spațiu tilacoidal. Toate procesele de transport de electroni au loc în membrana tilacoidă. Pentru a produce ATP, H^+ este pompat în spațiu tilacoidal și un reflux de H^+, printr-o ATP sintetază, produce apoi ATP în stroma cloroplastului.

Noțiunea de plastid se aplică la diferite organite din celulele vegetale, precum leucoplastele, cromoplastele, amiloplastele etc. Plastidele nediferențiate poartă denumirea de proplastide. Continuitatea unor asemenea organite are la bază prezența materialului genetic, a ADN plastidial, precum și complexele interdependențe dintre genomul nuclear și organite.

Asemănător sintezei mitocondriilor, biosinteza cloroplastelor implică contribuția a două sisteme genetice separate. Majoritatea proteinelor din cloroplaste sunt codificate de ADN nuclear, sunt sintetizate în ribozomii din citosol și importate în aceste organite. Traficul de proteine din citosol spre organite este unidirecțional. Există o strictă coordonare celulară a contribuției celor două sisteme genetice în funcționarea cloroplastelor.

Ca și mitocondriile, niciodată cloroplastele nu se nasc „de novo", ci prin diviziunea organitelor preexistente, după un model de constricție mediană, de tipul diviziunii celulei bacteriene, procesul având loc preferențial în interfază. Replicarea ADNcl nu este restrictă la faza S a ciclului celular, putând avea loc în tot cursul acestuia. Nu toate moleculele de ADN din cloroplast se replică sincron. *Nu este cunoscut cu claritate modul de replicare a ADNcl.*

Plastidul conține mai mult decât o singură moleculă de ADN. În cloroplast moleculele de ADN se pot agrega, putând fi vizualizate electronomicroscopic ca nucleoizi cloroplastici. Astfel, la **Beta vulgaris**, precum și la alte specii de plante, s-au descris între 10 și 100 de regiuni cu ADN, depinzând de modelul general al diferențierii celulare, controlat de genomul nuclear, precum și de starea dezvoltării și diferențierii celulelor și țesuturilor plantei. În celulele meristematice, există plastide mici, care au doar puține zone cu ADN, pe când în celulele frunzelor, cu cloroplaste mari, din parenchimul spongios, pot fi întâlnite foarte multe regiuni cu ADN cloroplastic (ADNcl). Utilizarea fluorocromului DAPI, specific pentru

ADN, a permis identificarea la **Pisum sativum** a 10–15 zone nucleoidale cu ADNcl, în cloroplastele mai mari, ceea ce sugerează prezența a 2 – 3 molecule de ADNcl per nucleoid cloropastic, pe când în cloroplastele mai mici, numărul de copii de ADNcl per nucleoid cloroplastic este mai mic. La **Chlamydomonas reinhardtii** există un număr de 80 de molecule de ADN per cromatofor — cloroplastul unic al acestei alge flagelate unicelulare – ceea ce reprezintă aproximativ 7% din totalul ADN celular. În cloroplastele din frunzele de porumb se află între 20 și 40 de molecule de ADN per organit, existând între 20 și 40 de molecule de cloroplaste per celulă, iar ADNcl reprezintă aproximativ 15% din ADN celular total. Moleculele de ADNcl sunt distribuite în clusteri, în stroma organitului, acesta realizând, în unele cazuri, contact cu anvelopa nucleară.

Asemănător celulelor procariote și mitocondriilor, cloroplastele se divid prin constricție mediană, după modelul diafragmatic (fig. 18). ADN cloroplastic, precum și cel mitocondrial se replică după modelul „buclei D“, adică al îndepărtării (“*displacement*“) uneia dintre cele două catene ale moleculei inițiale (fig. 19).

Funcțiile cloroplastului sunt codificate în proporție de 20%, de însuși genomul cloroplastic, și în proporție de 80%, de către genomul nuclear.

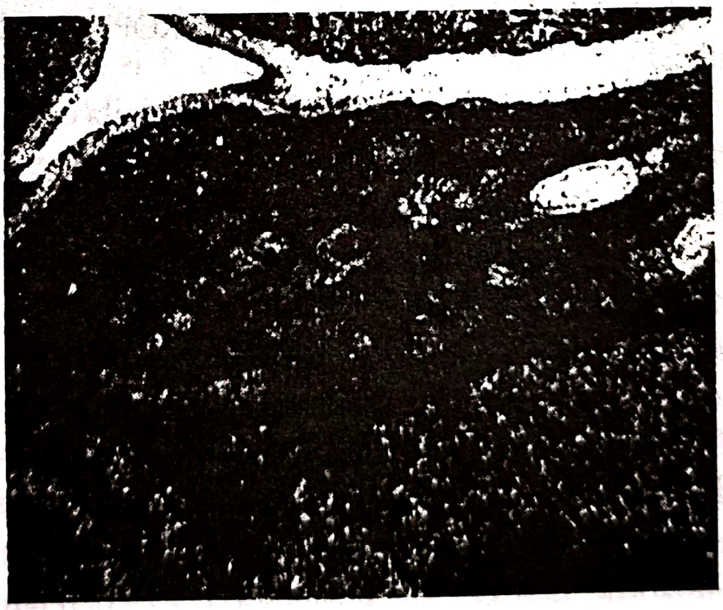


Fig. 18 — Diviziunea cloroplastului din frunze de *Trifolium pratense*, după mecanismul constricției primare. În cloroplastul-fiu din partea dreaptă se poate distinge o structură fibrilară ce ar putea reprezenta ADN cloroplastic. (original I.. Gavrilă și Gr. Mihăescu).

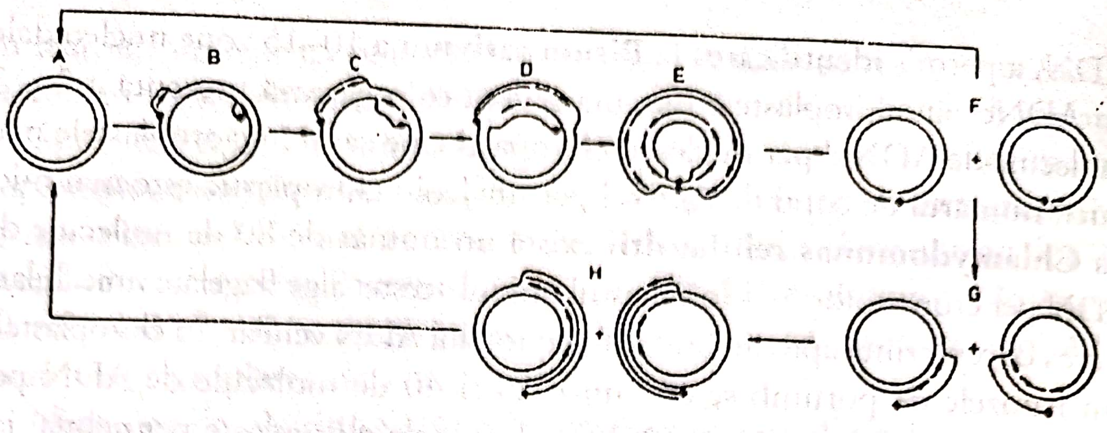


Fig. 19 — Modelul de replicare al ADN plastidial.
A – moleculă parentală circular închisă; B – moleculă cu bucle D; C – moleculă cu bucle D extinse; D, E – tip Cairns intermediar replicativ; F – molecule fiice crestate; G, H – cercuri rotative; Liniile subțiri și groase marchează catenele opuse ale moleculei. Liniile cu săgeți sunt catene fiice. Semnul • indică pozițiile celor două origini ale sintezei buclei D. Semnul ♦ indică terminalul unei runde Cairns de replicare. (după Kolodner și Tewari, 1975 și Tewari și Meeker, 1979)

Cartarea de restricție arată că, spre deosebire de structura ADNmt, structura ADNcl este foarte stabilă, în cadrul unei specii.

4.3. ANALIZA GENOMULUI CLOROPLASTIC

Genomul cloroplastic are ca substrat fizic molecula circulară de ADNcl, necomplexat cu histone. Această moleculă este bicatenară și circulară. Dimensiunea ADNcl este cuprinsă între 120 și 180Kb, fiecare cloroplast putând avea zeci de copii identice ale genomului cloroplastic. Secvențierea completă a ADNcl s-a realizat la hepatica *Marchantia polymorpha*, la *Nicotiana tabacum* și la *Oryza sativa*.

Genomul cloroplastic conține doar unele gene implicate în structura și funcția organitului, reprezentând 20% din capacitatea de codificare, majoritatea determinanților genetici ai acestora fiind localizați în genomul nuclear, și reprezintă 80% din necesarul de codificare pentru cloroplast.

Cartarea de restricție și cartarea fizică a genomului cloroplastic

Utilizarea enzimelor de restricție asupra ADNcl a permis realizarea **cartării de restricție** a genomului cloroplastic la *Zea mays*, *Spinacea oleracea*, *Oenothera sp.* și *Euglena gracilis.* S-a constatat că secvența de nucleotide a ADNcl este organizată segmentar, prezentând regiuni unice, nerepetitive, și regiuni repetitive, cu 2–4 repetiții.

Primele hărți RFLP ale genomurilor nucleare la plante au fost realizate la porumb și tomate (Helentjaris și colab., 1986). Aceste genomuri sunt mari (aproximativ 10^{10}pb). Metodologia cartării RFLP a genomurilor vegetale nucleare este complexă. Mult mai simplă este cartarea RFLP a genomurilor extranucleare, care sunt mai mici. Depinzând de enzima utilizată într-o asemenea cartare, numărul benzilor electroforetice variază între 10 și 60, în geluri de agaroză.

Cattalico (1985) a pus bazele teoretice ale biosistematicii cloroplastelor, prin utilizarea ADN plastidial ca probă moleculară. Dimensiunea moleculelor de ADNcl diferă la diferiți taxoni vegetali și aceste diferențe sunt utilizate în măsurarea distanțelor evolutive. Deși virtual ADNcl de la toate plantele verzi prezintă o structură generală foarte similară, cu o repetiție inversată și o regiune în copie unică, inserții, inversii și deleții apar într-o manieră tipică, la diferite familii de plante. Leguminoasele (Fabaceae) și alga *Euglena* fac excepție, acestea neavând repetiția inversată (Palmer, 1985).

Hosaka (1986) și-a pus întrebarea: cine este mama cartofului? Pentru a răspunde la această întrebare, el a comparat ADNcl de la 44 linii aparținând la 16 specii sălbatice și 7 specii cultivate de *Solanum*, identificând 7 tipuri de genomuri plastidiale, utilizând 5 enzime de restricție BamH I, Hind III, Kpn I, Pvu II, Xho I. Analiza ADN plastidial a permis să se tragă concluzia că *S. goniocalyx* și *S. phureja*, *S. xcaucha* și ssp. *andigena* au derivat din *S. stenotonum* sau tipul său primitiv care a putut deriva, la rândul său, din *S. canasense*. Genomul plastidial al cartofului european, *S. tuberosum* ssp. *tuberosum* a fost introdus prin cartoful chilean. ADNcl al cartofilor cultivați diferă de ADNcl al cartofilor sălbatici, doar printr-o deleție de aproximativ 400 pb, localizată în apropierea genei **rbcL**. ADNcl de la *S. tuberosum* a fost desemnat ca *tip T* și acesta prezintă cel mai înalt grad de omologie față de *tipul W* de ADNcl al ancestorilor sălbatici de *S. andigena.* Aceste date sugerează că *S. andigena* este cel mai probabil strămoș care a donat citoplasma sa lui *S. tuberosum* chilean. Asemenea studii au fost efectuate și la grâu (*Triticum*) și *Aegilops*. Repetițiile dispersate din ADNcl al grâului și, cel mai probabil, la toate plantele superioare, sunt implicate în evenimente de recombinarea ADN cu semnificație evolutivă. La grâu și *Aegilops* au fost identificate 16 tipuri de plastom (Ogihara și Tsunewaki, 1988). Analize RFLP asupra ADNcl au arătat că schimbările din ADNcl constau din substituții de nucleotide, inserții și deleții de ordinul a 100 pb. Asemenea studii au mai relevat faptul că genomurile extranucleare au evoluat la o rată mai redusă decât genomul nuclear. Asemenea analize RFLP asupra ADNcl au fost efectuate la multe alte specii, precum cele de *Tripsacum*

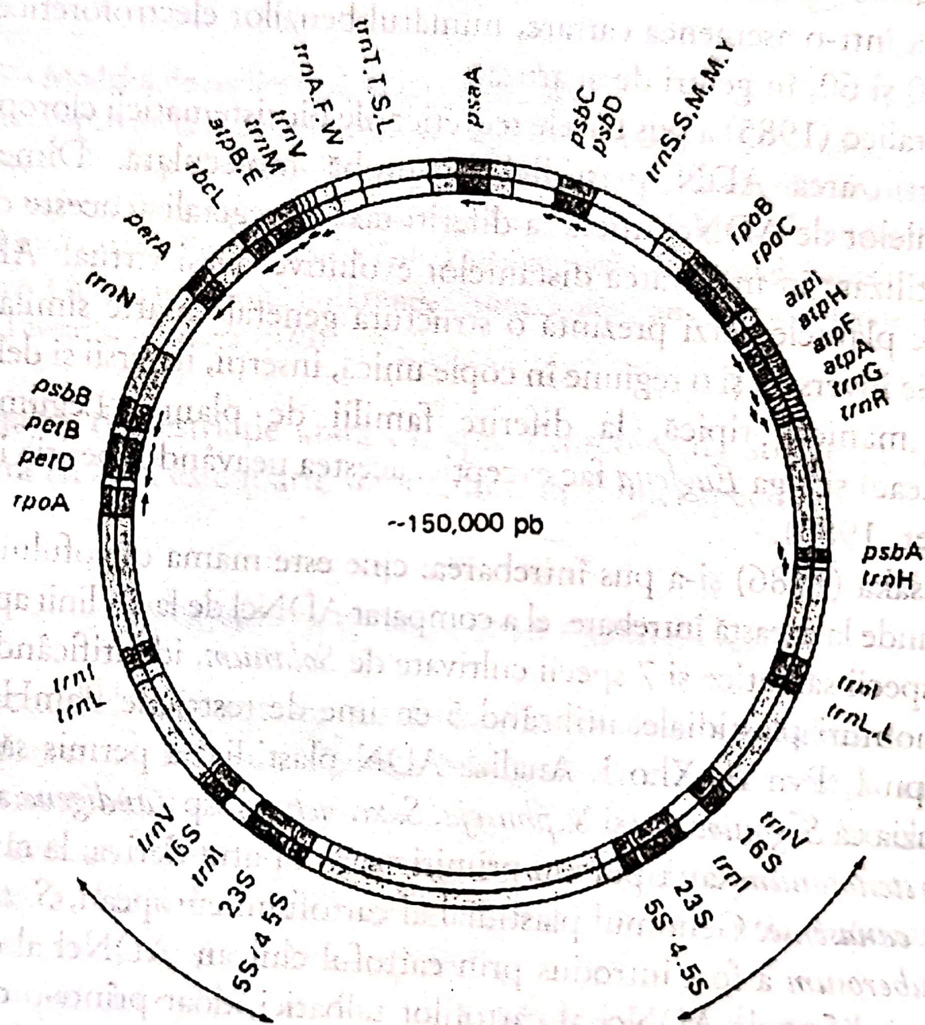

trnT.T.S.L
trnA.F.W
trnV
trnM
atpB.E
rbcL
psaA
psbC
psbD
trnS.S.M.M.Y
petA
trnN
rpoB
rpoC
atpI
atpH
atpF
atpA
trnG
trnR
psbB
petB
petD
rpoA
~150,000 pb
psbA
trnH
trnI
trnL
trnI
trnL.L
trnV
16S
trnI
23S
5S/4.5S
trnV
16S
trnI
23S
5S 4.5S

Fig. 20 — Diagrama schematică a ADN cloroplastic de spanac, în care se redă localizarea anumitor gene. Săgețile duble din exterior redau repetițiile inversate care conțin gene pentru ARN ribozomal. Săgețile mici indică direcția de transcripție: *trn* = gene ARNt; *psa* = componentele fotosistemului I; *psb* = componentele fotosistemului II; pet = polipeptidele complexului citocrom; *rbcL* = subunitatea mare a ribulozo 1,5-bifosfat carboxilaza/oxigenaza; *atp* = subunități ale complexului H⁺-ATPază; *rpo* = subunități ale ARN polimerazei. Genele proteinelor nu sunt indicate.

sp, *Zea mays* și subspeciile sale, *Z. mays mays*, *Z. mays ssp. mexicana*, și *Zea mays ssp. parviglumis* apoi *Oryza sativa* și *O. glaberima*, mei (*Eleusine coracana ssp. coracana*, *E. india* și *E. coracana ssp. africana*), *Avena sp.*, *Betta*, *Vicia*, *Clarkia*, *Prunus*, *Pinus*, *Epilobium*, *Pelargonium* și *Oenothera*.

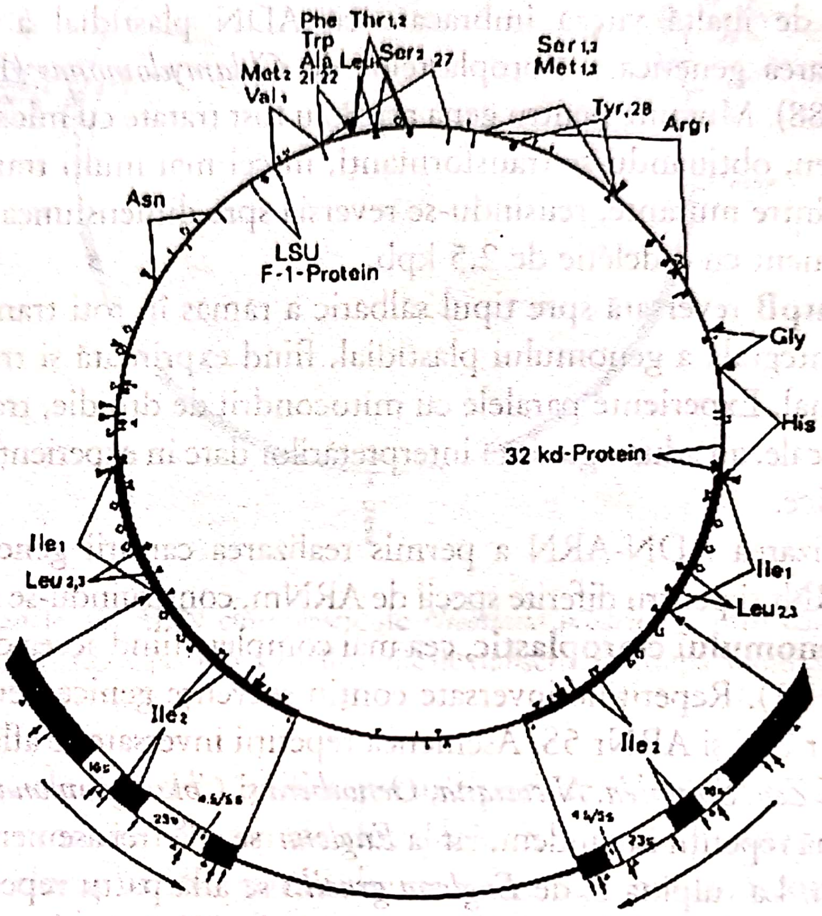

Phe
Thr1,2
Trp
Ala
Leu1
Ser2
27
21 22
Met2
Val1
Ser1,3
Met1,3
Tyr,28
Arg1
Asn
LSU
F-1-Protein
Gly
His
32 kd-Protein
Ile1
Leu2,3
Ile1
Leu2,3
Ile2
Ile2
16S
23S
4.5/5S
4.5/5S
23S
16S

Fig. 21 — Harta fizică a cromozomului cloroplastic de *Spinacia oleracea*. Cromozomul cloroplastic are 95MD sau 140Kpb. Repetiția inversată este redată prin regiunile groase de arcuri de cerc. Ordinea de cartare a diferitelor fragmente de ADN a fost determinată prin digestie reciprocă cu mai multe endonucleaze de restricție. Pozițiile relative de tăiere ale endonucleazelor sunt redate la scală și indicate prin următoarele simboluri: Sal I=▼, Pst I – ◆, Kpn I= **T**, Xma I – ▾, Xho I= **,**, Bgl I= ∇, Pvu I= ◊, Sac I= ❤. Localizarea celor două seturi de gene pentru ADNr în cadrul repetiției inversate este redată în desene mărite. Simbolurile specifică situsurile de clivare ale Eco RI= **↓**, Bam HI= ↓, Sma I= ❤. Polaritatea de transcripție în regiunea ADNr este dinspre gena 16S spre gena 23S (săgeata). Pentru cartarea genelor pentru ARNt și a genelor pentru polipeptide, segmentul cel mai mic de ADN la care s-a observat hibridizarea este indicat pentru fiecare component unic (după Herrmann și Possingham, 1980).

În ADNcl al unor specii de *Asteraceae* s-a identificat o inversie de 22 kpb care, după opinia lui Jansen și Palmez (1987) definește o divergență evolutivă, cel mai primitiv trib al familiei fiind reprezentat de către *Barnadesiine*.

Bombardamentul celulelor de *Chlamydomonas reinhardtii* cu microproiectile de înaltă viteză îmbrăcate cu ADN plastidial a condus la transformarea genetică a cloroplastelor de *Chlamydomonas* (Boynton și colab., 1988). Mutante pentru gena **atpB** au fost tratate cu microproiectile de tungsten, obținându-se transformanți, în cei mai mulți transformanți ai uneia dintre mutante, reușindu-se reversia spre dimensiunea normală a unui fragment cu o deleție de 2,5 kpb.

Gena **atpB** reversată spre tipul sălbatic a rămas în toți transformanții ca parte integrală a genomului plastidial, fiind exprimată și transmisă în mod normal. Experiențe paralele cu mitocondrii de drojdie, transformate pe aceeași cale, au adus siguranță interpretărilor date în experiențele cu gene cloroplastice.

Hibridizarea ADN-ARN a permis realizarea cartării genelor pentru ARNr, ARNt și pentru diferite specii de ARNm, construindu-se astfel **harta fizică a genomului cloroplastic**, cea mai completă fiind aceea de la spanac (fig. 20 și 21). Repetițiile inversate conțin secvențe genice pentru ARNr 16s, ARNr 23S și ARNr 5S. Asemenea repetiții inversate se află în număr de două la *Zea*, *Spinacea*, *Nicotiana*, *Oenothera* și *Chlamydomonas*. La *Pisum* se află două repetiții în tandem, iar la *Euglena* se află trei asemenea repetiții în tandem. La tulpina Z de *Euglena gracilis* se află patru repetiții pentru ARNr 16S. La *Vicia faba* se întâlnește un singur set de gene pentru ARNr cloroplastic, ceea ce constituie o excepție, în lumea plantelor.

Genomul cloroplastic al plantelor superioare conține aproximativ 120 de gene. La alga roșie *Porphyra purpurea* s-au identificat aproximativ 125 de gene cloroplastice, dintre care 46% nu au corespondenți în genomul cloroplastic al plantelor terestre.

Componentele genomului cloroplastic se grupează în două categorii: gene care sunt implicate în biogeneza organitului și gene care, prin produșii lor, sunt implicate în desfășurarea procesului de fotosinteză. În cloroplaste există un sistem de codificare care nu este diferit de cel nuclear și un sistem de decodificare cu ribozomi caracteristici organitului și o sinteză proteinică intracloroplastică.

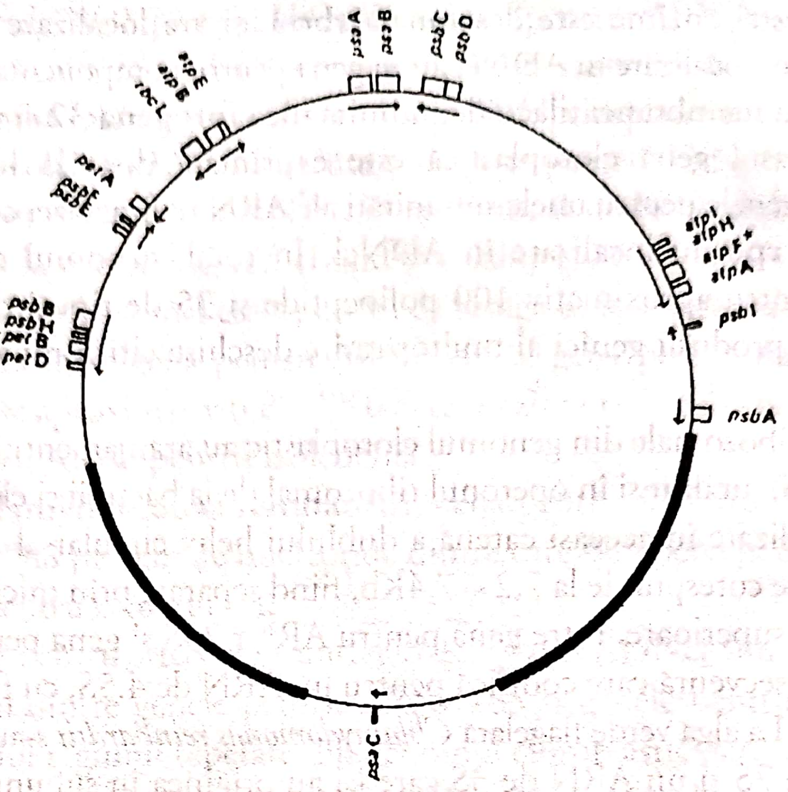


Fig. 22 — Genele din ADN cloroplastic de *Nicotiana tabacum* pentru componentele aparatului fotosintetic. Săgețile indică direcțiile de transcripție. (după Shinozaki și colab., 1998)

Genomul cloroplastic codifică patru tipuri de ARNr 16S, 23S, 5S și 4,5S, 20 de proteine ribozomale cloroplastice, unele subunități ale ARN polimerazei cloroplastice, mai multe proteine ce reprezintă componente ale fotosistemelor I și II, subunități ale ATP-azei cloroplastice, anumite componente ale complexelor enzimatice din lanțul transportor de electroni, precum și subunitatea mare a enzimei ribulozobifosfatcarboxilaza (Rubisco), precum și 30 de tipuri de ARNt cloroplastici (fig. 22). În plus, secvențele ADNcl codifică pentru 40 de proteine a căror funcție nu este cunoscută. Toate proteinele cunoscute din cloroplast sunt componente ale unor complexe proteinice mai mari, în care intră una sau mai multe subunități codificate de ADN nuclear. Cele patru gene ribozomale sunt localizate la nivelul unui segment de 25Kb, care este repetat cu orientare inversă, după un interval de aproximativ 15Kb.

Gena pentru subunitatea mică a ribulozo 1,5 – bifosfat carboxilazei, desemnată **rbcS** are localizare nucleară, pe când gena pentru subunitatea mare a acestei enzime este desemnată **rbc-L** și are localizare în ADNcl (fig. 22). Tot localizare în ADNcl are și gena pentru componenta proteinică de 32Kda, a membranei tilacoide, numită încă **fotogena 32** și simbolizată **psbA**. Această genă cloroplastică este exprimată doar la lumină. De asemenea, genele pentru unele subunități ale ARN polimerazei cloroplastice desemnate **rpo** au localizare în ADNcl. În total, genomul cloroplastic codifică pentru aproximativ 100 polipeptide și 35 de tipuri de ARNr și ARNt, dar produșii genici ai multor cadre deschise citirii nu au fost încă identificați.

Genele ribozomale din genomul cloroplastic au aranjamentul ribozomal 16S-23S-5S, întâlnit și în operonul ribozomal de la bacterii și cianobacterii și sunt localizate în aceeași catenă a dublului helix circular al ADNcl, pe o lungime ce corespunde la 7,2 – 7,4Kb, fiind separate prin mici spațiatori. La plantele superioare, între gena pentru ARNr 23S și gena pentru ARNr 5S se află o secvență care codifică pentru un ARN de 4,5S, cu funcție încă neprecizată. La alga verde flagelată *Chlamydomonas reinhardtii* s-au identificat un ARN de 7S și un ARN de 3S care își au originea în subunitatea mare a ribozomilor cloroplastici și sunt transcriși de pe sectoare de ADNcl situate între gena pentru ARNr 16S și gena pentru ARNr 23S.

O particularitate neobișnuită a organizării cistronilor ribozomali din genomul cloroplastic este reprezentată de faptul că genele pentru ARNr 23S sunt întrerupte de o **secvență interpusă** de 870 perechi de nucleotide (Rochaix și Malnoe, 1978). Capetele acestei secvențe intercalate prezintă o complementaritate parțială și regiunile flancatoare ale sale au secvențe comune cu gena pentru ARNr 23S, de la bacteria *Escherichia coli*. Genele pentru ARNr 16S și ARNr 23S sunt separate de o secvență spațiatoare care diferă ca lungime de la o specie la alta. Acest spațiator conține (în afara de genele pentru ARN 3S și ARN 7S, de la *Chlamydomonas*), prin analogie cu bacteria *E. coli*, secvențe care hibridizează cu ARNt. Pe această cale (a hibridării moleculare) a fost identificată la acest nivel, gena pentru ARN_t^{Ile} și gena pentru ARN_t^{Ala}, în spațiatorul de la *Euglena* (Keller și colab., 1980), precum și gena pentru ARN_t^{Ile}, la *Spinacea oleracea* (Bohnert și colab., 1979). Secvențierea regiunilor clonate pentru ARNr 16S și 23S din ADNcl de *Zea mays* a evidențiat prezența în acest spațiator din ADNcl a două gene întrerupte și anume pentru ARN_t^{Ile} și ARN_t^{Ala} (Kossel și colab., 1980). Aceste gene conțin secvențe interpuse de 949 perechi de nucleotide (pentru

ARN_t^{Ile} și de 850 perechi de nucleotide (pentru ARN_t^{Ala}). Secvențele interpuse încep la o bază sau două baze distanță față de secvența anticodonului, așa cum s-a observat și la ARN_t citoplasmatic, de la drojdii (Knapp și colab., 1979). Existența unei gene pentru ARN_t^{Glu}, sau a două gene pentru ARN_t^{Ile} și ARN_t^{Ala}, în spațiatorul de la nivelul ADNr, este întâlnită și la bacteria *E. coli* (Lund și colab., 1976).

Operonul ribozomal cloroplastic, de la alga unicelulară verde **Chlorella** sp. prezintă între gena pentru ARNr 16S și gena pentru ARNr 23S un spațiator de aproximativ 6,8 – 7Kb care prezintă trei ORF-uri și o singură genă pentru ARNt pentru izoleucină.

La **Chlamydomonas reinhardtii**, gena pentru ARNr 23S conține un intron de 888 perechi de nucleotide dintre care 489 perechi de nucleotide codifică pentru o maturază.

Genele pentru ARN de transfer (ARN_t) din ADNcl sunt localizate în spațiatorul dintre genele pentru ARNr 16S și genele pentru ARNr 23S, de la nivelul regiunii repetate din genomul cloroplastic dar, în majoritatea cazurilor, se află în afara secvenței ARNr și în sectorul mai mare al celor două regiuni nerepetate ale genomului (Hallick și colab., 1978).

Dintre cele 35 specii de ARN_t, identificate la spanac, 27 corespund la 16 aminoacizi și au fost identificate prin aminoacilare cu aminoacil sintetaze corespunzătoare. În harta genetică a ADNcl de la spanac au fost localizate 21 de gene care codifică pentru ARN_t pentru 14 aminoacizi diferiți. Dintre acestea, 15 gene, corespunzând la 12 aminoacizi diferiți, au fost detectate în regiunea mare, aflată în copie unică, din ADNcl. În afara genei pentru ARN_t^{Ile}, în spațiatorul dintre genele pentru ARNr 16S și ARNr 23S, repetițiile conțin în afara unității ARNr și gene pentru ARN_t^{Ile}, ARN_{t1}^{Leu} și ARN_{t2}^{Leu}. La porumb (*Zea mays*) au putut fi localizate 13 gene pentru ARN_t dintre care, 9 asemenea gene sunt localizate în regiunea mare, aflată în copie unică. Regiunile cu repetiții inversate conțin, în afară de gene ARNr și gene pentru ARN_t^{Ile}, ARN_t^{Leu}, ARN_t^{His} și ARN_t^{Val}. La *Euglena* au fost cartate 10 gene ARN_t, dintre care 7 se află în regiunea copie singulară. Celelalte 3 gene ARN_t au putut fi localizate în repetițiile în tandem, genele ARN_t^{Ile} și ARN_t^{Ala}, în spațiatorul dintre genele pentru ARNr 16S și ARNr 23S și o genă pentru ARN_t^{Trp} sau ARN_t^{Glu}, în afara spațiatorului (Keller și colab., 1980).

Secvențierea ARN$_t$ cloroplastic s-a realizat pentru ARN$_t^{Phe}$, de la *Euglena* și *Phaseolus*, pentru ARN$_t$ inițiator desemnat ARN$_t^{FMet}$, de la *Spinacea* și *Phaseolus*, ARN$_t^{Met}$ (utilizat în etapa de elongare), de la *Spinacea*, pentru ARN$_t^{Thr}$ și trei ARN$_t^{Leu}$ izoacceptori, de la *Phaseolus*. Unele caracteristici specifice ARN$_t$ cloroplastic includ metilarea secvenței G-C din bucla dihidrouridinei și o predominare a T-Y-C-A în bucla IV. În general, se constată o mai mare omologie a acestor ARN$_t$ cu cele de la procariote, decât cu cele din citosolul propriei celule eucariote, cu excepția ARN$_t^{Thr}$ atât de la procariote, cât și de la eucariote. Între ARN$_t^{Fmet}$ din cloroplastele de spanac și fasole există o omologie de 92% și ambele au trăsături ale unui ARN$_t$ inițiator de la procariote, prezentând un nucleotid C-5' terminal, rămas neîmperecheat, și o secvență T-Y-C-A, în bucla IV. Omologia de secvență cu ARN$_t$-urile inițiatoare procariote (80%-84%) este mult mai mare decât cu ARN$_t^{Met}$ eucariotice (64%-69%) și cu ARNt^{Fmet} mitocondriale (55%-62).

Secvențele ARN$_t^{Phe}$, de la *Euglena* și de la *Phaseolus*, diferă doar prin cinci nucleotide și unele mici diferențe din modificările posttranscripționale, ceea ce sugerează stabilitatea structurii primare a ARN$_t$ din cursul evoluției. Similitudinea dintre ARN$_t$ cloroplastic de la *Euglena* și ARN$_t$ cloroplastic, de la plantele superioare apare a fi o excepție; din 14 specii moleculare de ARN$_t$ de la *Euglena*, care au fost studiate, numai ARN$_t^{Phe}$ a hibridizat cu ADN cloroplastic de la porumb (*Zea mays*) și fasole (*Phaseolus sp.*).

Gena pentru subunitatea mare a RuBP – carboxilazei, enzima care este responsabilă pentru cataliza primei etape din ciclul Calvin, a fost cel mai bine studiată. Această enzimă se mai numește ribuloză — 1,5 – bifosfat carboxilaza, RuPBCaza sau Rubisco. Ea catalizează carboxilarea ribulozo-bifosfatului cu CO$_2$, spre a se produce acid 3–fosfoglicerid. Această enzimă este de fapt identică cu **Proteina Fracția I (F-I-P)**, întâlnită în cantitate foarte mare, în frunzele plantelor verzi. In vivo, RuBPCaza este un octamer alcătuit din patru subunități mici identice, fiecare având o greutate moleculară de 12 000, și patru subunități mari, identice, fiecare având o greutate moleculară de 56 000. Subunitatea mică este codificată de ADN nuclear, pe când, subunitatea mare este codificată de ADN cloroplastic (Chan și Wildman, 1972).

Gena cloroplastică pentru subunitatea mare a RuBPCazei este desemnată **gena LS** și este cel mai bine studiată dintre genele cloroplastice. La

Zea mays, ea este localizată în harta fizică a ADNcl, într-o secvență lungă de 2500 perechi de nucleotide a fragmentului BamH I, care este o parte a fragmentului Sal IA (Bedbrook și colab., 1979).

În anul 1980, McIntosh, Poulsen și Bogorad au reușit să determine secvența de nucleotide a genei LS, din ADN cloroplastic de porumb. Secvența codificatoare a acestei gene are 1425 perechi de nucleotide. Pe baza secvenței de nucleotide a genei a fost dedusă secvența de aminoacizi a subunității mari a enzimei RuBPCaza (Rubisco).

Interesant este faptul că structura promotorului acestei gene prezintă particularități incompatibile cu cele ale promotorilor procariotici sau eucariotici, deși are un situs de legare la ribozom a ARNm, tipic procariotic, care este situat la 5 nucleotide în amonte de nucleotidul N terminal pentru metionină (5' – GGAGG – 3') și care este complementar cu secvența „*Shine – Dalgarno*“ de la terminalul 3' al ARNr cloroplastic 16S, de la porumb.

Pentru decodificare, sunt utilizați aproape toți codonii codificatori, cu excepția a trei triplete: una pentru Thr, una pentru Arg și una pentru Ser, codonii fiind evident traduși de către „codul universal“, neidentificându-se variațiuni de tipul celor din codul genetic mitocondrial. Codonul stop natural este codonul ocru (UAA). Există colinearitate strictă între secvența genei LS, secvența ARNm LS și polipeptidul LS, ceea ce denotă absența intronilor din această genă. Cu alte cuvinte, structura sa este nemozaicată, continuă, neîntreruptă.

La *Chlamydomonas reinhardtii*, gena LS a fost localizată în harta fizică a ADNcl, în fragmentul R15, al restrictelor EcoR I (Rochaix și Malnoe, 1978).

Genele pentru polipeptidele tilacoidale

Asemenea gene au fost localizate în harta fizică a ADN cloroplastic de la **Chlamydomonas reinhardtii**. Este vorba de genele pentru polipetidele D_1 și D_2. Sunt și alte polipeptide tilacoidale desemnate 4.1, 4.2, 5 și 6. La porumb și la **Chlamydomonas,** a fost stabilită poziția genei pentru proteina de 32Kda a cărei transcripție este stimulată de lumina naturală. ADN cloroplastic pare a conține doar o singură copie a acestei gene. Localizarea ei este la nivelul regiunii mari în copie unică, din ADNcl, în vecinătatea uneia dintre cele două repetiții inversate.

4.4. ARANJAMENTUL STRUCTURAL – FUNCȚIONAL AL GENELOR CLOROPLASTICE ȘI REGLAREA ACTIVITĂȚII GENELOR CLOROPLASTICE

Genele cloroplastice sunt grupate în două categorii: genele sistemului genetic (ale aparatului de transcripție și translație cloroplastică) și genele sistemelor fotosintetice I și II. Genele sistemului genetic au un conținut mai bogat în GC, față de genele fotosintezei. La plantele superioare, genele nucleare au frecvent G sau C în cea de a treia poziție a codonilor, pe când genele cloroplastice au frecvent A, în această poziție.

Genele cloroplastice pentru ARNr sunt localizate în zone ale genomului cu repetiții inversate, desemnate zone IR, acestea putând avea lungimi de 20 – 28Kb, separate de regiuni cu secvențe unice. Acest tip de organizare este caracteristic algei unicelulare *Chlamydomonas reinhardtii*, nu însă și altor specii precum *Phaseolus aureus*, *Pisum sativum* sau *Euglena gracilis*. Tulpina Z-Hal de *E. gracilis* are în ADNcl o zonă IR, repetată în tandem de tei ori, pe o lungime de 5,6 – 5,8Kb. La *Chlamydomanas moewusii* și *C. eugametos* se întâlnește o singură zonă IR, în ADNcl. Aceasta conține genele **psbA** și **rbcL** pe când, la *C. reinhardtii*, în IR se află doar gena **psbA**, în timp ce gena **rbcL** se află la o distanță de 15pb de IR.

Cele mai multe gene plastidiale sunt aranjate în operoni și sunt transcrise în ARNm precursor, policistronic. Excepție fac genele **rbcL** și **psbA** care sunt monocistronice. Operonul **psbB – petD** a fost riguros studiat la spanac (*Spinacea oleracea*), tutun (*Nicotiana tabacum*), porumb (*Zea mays*), mazăre (*Pisum sativum*), orz (*Hordeum vulgare*) etc. Acest cluster genic este transcris ca o unitate policistronică și este apoi rapid procesată. Omologie remarcabilă de secvență genică și de aranjament genic al subunităților ATPazei cloroplastice a fost evidențiată între *Nicotiana tabacum* și cianobacteriile *Synechococcus* 6301 și *Anacystis nidulans* (Cozens și Walker, 1987; Shinozaki și colab., 1988).

Aranjamentul genelor pentru ARNr din genomul cloroplastic este 16S – spațiator – 23S – spațiator – 5S și un asemenea aranjament este întâlnit și la cianobacteria *Anacystis nidulans* și bacteria *Escherichia coli*. În plus, la plantele superioare, apare al patrulea tip de ARNr, de 4,5S ce are 65 — 103 ribonucleotide, fiind un corespondent al subunității ribozomale mari. Genele pentru ARNr 16S au 1491 perechi de baze, pe când la **E. coli** acestea au 1541pb, prezentând o omologie de 74%. Între ADNr 23S de **E. coli** și genele corespondente din genomul cloroplastic există o omologie de 67%, pentru tutun, și de 71%, pentru porumb. În ADNr 23S de la porumb se află trei secvențe de inserție care amintesc de IS-urile din genomul bacterian. ADNr 23S, de la **Chlamydomonas reinhardtii,** conține un intron de 888 perechi de baze.

Între ADNr 5S, din cianobacteria **Anacystis nidulans,** și ADNr 5S, din cloroplastele plantelor superioare, omologia este considerabilă, ca de altfel, în toată seria viețuitoarelor.

Toate cele 32 tipuri de ARN_t, utilizate în sinteza proteinică din interiorul cloroplastului sunt codificate de către genomul cloroplastic și, spre deosebire de genele pentru ARN_t de la bacterii, care codifică și secvența terminală 3' CCA, genele pentru ARN_t cloroplastic, asemănător genelor ARN_t nucleare, sunt lipsite de această secvență codificatoare a trinucleotidului 3' CCA, aceasta fiind adăugată posttransripțional. La porumb și tutun, genele pentru ARN_t^{Ala} și ARN_t^{Ile} conțin introni în regiunea spațiatoare, cu omologie de 95%, ceea ce sugerează originea lor comună. Prezența intronilor în genele cloroplastice sprijină ipoteza existența ancestrale a intronilor.

Structura promotorilor genelor cloroplastice este similară celei de la *Escherichia coli*, prezentând regiunea -10 (cutia Pribnow) și regiunea -35, necesare cuplării ARN polimerazei. În cazul genelor pentru ARNr 16S din cloroplastele de *Euglena gracilis*, codonul start (ATG/ TAC pentru Metionină) este plasat la aproximativ 10–11 nucleotide față de zona omoloagă a promotorului corespunzător din cromozomul bacterian.

Terminatorii transcrierii din genele cloroplastice, asemănător bacteriilor și cianobacteriilor, prezintă unele secvențe care formează structuri **hairpin**.

În genele pentru ARNr, ARN_t și pentru polipeptide cloroplastice apar introni cu o distribuție complexă și specifică. Astfel, în genele pentru ARN_t de **Euglena** nu se află introni, dar aceștia sunt prezenți în genele pentru polipeptidele cloroplastice. Tot astfel, la plantele superioare, unele gene cloroplastice posedă, pe când altele nu posedă, introni.

La **Chlamydomonas reinhardtii**, spre deosebire de alte specii analizate, gena pentru ARNr 23S este discontinuă. Nu se poate da o explicație faptului că unele gene cloroplastice conțin introni, pe când altele nu conțin asemenea secvențe.

Intronii cloroplastici sunt similari cu intronii grupa I sau din grupa II din genele nucleare, **splicing**-ul lor implicând, după toate probabilitățile, mecanisme similare (Singer și Berg, 1990). Mulți introni cloroplastici nu au cadre deschise citirii, de lungime semnificativă. În intronul genei pentru

ARN_t^{Lys}, din cloroplastele de tutun, apare un cadru deschis citirii care are 509 codoni. În interiorul genei pentru ARNr 23S, din cloroplastul de **Chlamydomonas reinhardtii**, apare un cadru deschis citirii, care are 163 codoni. Proteinele a căror secvență de aminoacizi a fost dedusă pe principiul colinearității sunt omoloage cu porțiuni ale maturazelor codificate în intronii mitocondriali de drojdii. De aici, s-a dedus că și *în intronii cloroplastelor se află regiuni codificatoare funcționale.*

S-a identificat și mecanismul de **transsplicing** al moleculelor precursoare de ARNm. Astfel, exonul 5' al genei pentru proteina ribozomală cloroplastică **s1z** este transcris de pe o catenă a ADNcl, dar există și alți doi exoni care sunt transcriși de pe cealaltă catenă a ADNcl, aflată la o distanță de 30Kb. Cele două molecule precursoare de ARNm pentru **s1z** vor fi supuse procesului de **transplicing** care va produce o moleculă unică de ARNm matur pentru **s1z.**

Procesul de transsplicing al ARNm din cloroplaste a fost evidențiat și la transcriptul ARNm al genei **rps12**, de la *Marchantia polymorpha* și *Nicotiana tabacum.*

La *Nicotiana tabacum*, genomul plastidial conține o copie a părții **5'-rps12** (exon 1) și două copii ale părții **3'-rps12** (exonii 2 și 3) localizate în cadrul repetiției inversate. Exonul 1 are 38 de codoni, exonul 2 are 78 de codoni, pe când exonul 3 conține 7 codoni. Între exonul 2 și exonul 3 se interpune un intron de 536pb. Exonul 1 intră ca parte a unui ARNm policistronic, pe când exonii 2 și 3 intră ca părți ale unui alt ARNm policistronic. Acești exoni sunt sudați într-o aceeași moleculă funcțională de ARNm, printr-un proces de transsplicing. Același proces se înregistrează și la *Marchantia polymorpha*. La *Euglena gracilis* însă, gena **rps12** nu are intron, fiind cotranscrisă cu gena **rps7**.

Succesiunea evenimentelor de maturare a ARN este bine studiată la *Spinacea oleracea* (fig. 23).

Complexul proteinic al fotosisitemului I al tuturor plantelor verzi conține două proteine mari codificate de către gene din ADNcl. Aceste proteine sunt desemnate A_1 (codificată de către gena cloroplastică **psaA**) și A_2 (codificată de către gena cloroplastică **psaB**). Se mai raportează și existența unei gene **psaC,** care codifică o proteină de 9Kda, ce intră în componența fotosistemului II, în cadrul fotosistemului intrând nouă proteine codificate de gene plastidiale desemnate **psbA – psbI** (Shinozaki și colab., 1988). La

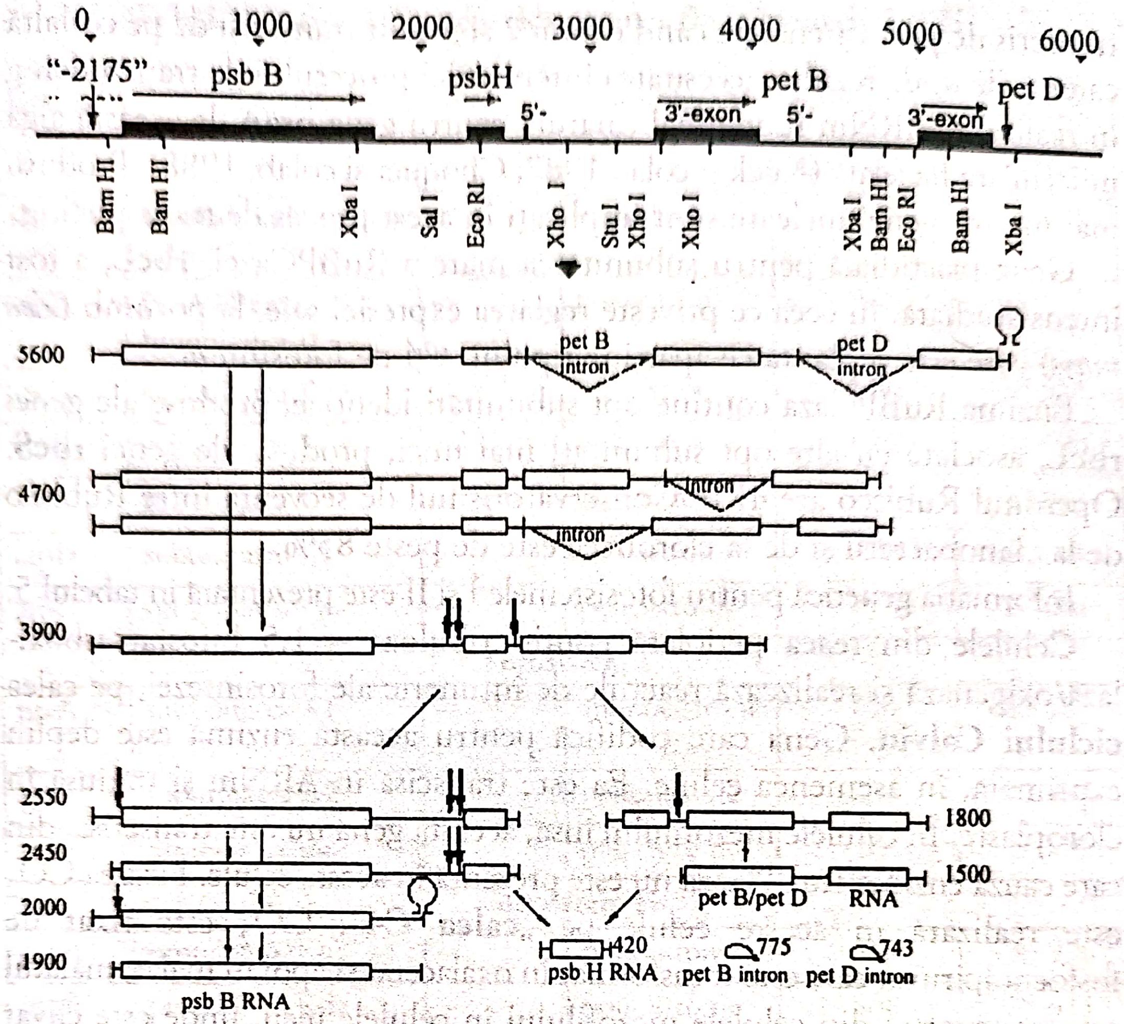

0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
"-2175"
psb B
psbH
5'-
3'-exon
pet B
5'-
3'-exon
pet D
Bam HI
Bam HI
Xba I
Sal I
Eco RI
Xho I
Stu I
Xho I
Xho I
Xba I
Bam HI
Eco RI
Bam HI
Xba I
5600
pet B intron
pet D intron
4700
intron
intron
3900
2550
2450
2000
1900
1800
1500
pet B/pet D RNA
420
psb H RNA
775
pet B intron
743
pet D intron
psb B RNA

Fig. 23 — Schema maturării ARN pentru operonul *psbB* de la *Spinacea oleracea*. Dimensiunea ARN este redată în nucleotide. Săgețile verticale indică situsurile de procesare care au fost identificate. Este indicată poziția buclelor hairpin dintre *psbB/psbH* și după *petD*. (după Westhoff și Herrmann, 1988)

porumb, a mai fost identificată încă o asemenea genă care a fost desemnată **psbK**, dispusă într-o regiune extinsă, de secvențe unice, între genele pentru ARN_t^{Ser} și ARN_t^{Gln} și care codifică pentru un polipeptid de 37 aminoacizi, cu o greutate moleculară de 4285 daltoni. La spanac, a mai fost descrisă încă o proteină în centrul de reacție pentru fotosistemul II și care are 4,8Kda (Inoue și colab., 1988).

La *Chlamydomonas reinhardtii*, gena **psaB** are 736 codoni, iar gena **psaA** constă din trei segmente exonice. Exonul 1 este separat de exonul 2, prin 50Kb, iar exonul 2 este separat de exonul 3, prin 90Kb. Exonul 1 este transcris de pe o catenă, pe când exonii 2 și 3 sunt transcriși de pe cealaltă catenă, de unde rezultă necesitatea intervenției procesului de transsplicing în realizarea ARNm funcțional (matur) pentru gena **psaA**, la această algă unicelulară flagelată (Kück și cola., 1987; Choquet și colab, 1988). Produșii mai multor gene nucleare sunt implicați în acest proces de transsplicing.

Gena plastidială pentru subunitatea mare a RuBPCazei, **rbcL,** a fost intens studiată, în ceea ce privește reglarea expresiei sale, la porumb (*Zea mays*) care este o plantă ce aparține tipului C4 de fotosinteză.

Enzima RuBPCaza conține opt subunități identice, produse ale genei **rbcL**, asociate cu alte opt subunități mai mici, produse ale genei **rbcS**. Operonul Rubisco are 4Kb. Conservatorismul de secvență între Rubisco de la cianobacterii și de la cloroficee este de peste 85%.

Informația genetică pentru fotosistemele I și II este prezentată în tabelul 5.

Celulele din teaca pețiolară conțin ribuloza – 1,5 bifosfatcarboxilază/oxigenază și realizează reacțiile de întuneric ale fotosintezei, pe calea **ciclului Calvin**. Gena care codifică pentru această enzimă este deplin exprimată, în asemenea celule. Ea este transcisă în ARNm și tradusă în cloroplaste. În celulele mezofilului însă, această genă nu este transcrisă, din care cauză enzima RuBPCaza nu este prezentă în aceste celule. Fixarea CO_2 este realizată în aceste celule pe „**calea C4**“. CO_2 este fixat de fosfoenolpiruvat care este transformat în oxalacetat și apoi în malat; malatul este transportat din celulele mezofilului în celulele tecii, unde este clivat în piruvat și CO_2 care apoi este fixat de RuBPCază și introdus în ciclul Calvin.

Diferențierea frunzei porumbului în celule ale tecii și celule ale mezofilului este condiționată de gene nucleare și transcripția genei plastidiale din celulele tecii și blocarea transcripției în celulele mezofilului sunt reglate de la nivelul genomului nuclear. Această reglare este foarte specifică și se exercită doar asupra acestei gene. „**Gena plastidială de 2,2Kb**“ care este localizată în imediată vecinătate a genei **rbcL** (separate doar de 200 perechi de nucleotide) este exprimată în ambele țesuturi.

Tabel 5. Informația genetică pentru fotosistemele I și II.

Genele	Produșii genici	Intron	Transcripton	Număr total de Aminoacizi*	Greutate moleculară în Kda**
rbcL	**Rubisco** subunitatea mare	–	monocistronic	477	51 402
atpA	**H^+ ATPaza** subunitatea α	–	policistronic	507	55 435
atpB	subunitatea β	–	policistronic	498	53 551
atpE	subunitatea ξ	–	policistronic	133	14 606
atpF	subunitatea I	695pb	policistronic	184	20 941
atpH	subunitatea III	–	policistronic	81	7 990
atpI	subunitatea IV	–	policistronic	247	27 001
Fotosistem I					
psaA	subunitatea A1	–	monocistronic (?)	750	82 985
psaB	subunitatea A2	–	policistronic	734	82 403
psaC	proteina 9Kda	–	policistronic	81	9 038
Fotosistem II					
psbA	proteina 32Kda	–	policistronic	353	39 970
psbB	proteina 51Kda	–	policistronic	508	65 011
psbC	proteina 44Kda	–	policistronic	473	51 906
psbD	proteina D2	–	policistronic	453	39 532
psbE	citocrom b 559	–	policistronic	83	9 306
psbF	citocrom b 559	–	policistronic	39	4 484
psbG	proteina G	–	policistronic	284	32 323
psbH	fosfoproteina 10Kda	–	policistronic	73	7 759
psbI	proteina I	–	policistronic	52	6 065
Transfer de electroni					
petA	citocrom f	–	policistronic	320	35 244
petB	citocrom b6	753pb	policistronic	215	24 135
petD	subunitatea 4	742pb	policistronic	160	17 458

* numărul de aminoacizi este dedus din secvențele ADN

** greutatea moleculară a produșilor primari

4.4. TRANSCRIPȚIA ȘI TRANSLAȚIA GENETICĂ CLOROPLASTICĂ

Sistemul cloroplastic de transcripție și translație, specific organitului, constituie baza moleculară a statutului de semiautonomie pe care îl are cloroplastul.

În cloroplast, transcripția este realizată de către o ARN polimerază dependentă de ADNcl, ferm legată la structuri membranare. Există unele indicii privind existența unei a doua ARN polimeraze, cantonată în stroma organitului, cu proprietăți distincte de ale celei legată la membrane. Subunitățile ARN polimerazei cloroplastice sunt desemnate α, β, β' și β'' și ele sunt codificate de genele **rpoA, rpoB** și **rpoC**. La tutun și la porumb, genele **rpoB** și **rpoC** sunt cotranscrise.

ADNcl de la diferite specii de plante (*Marchantia polymorpha, Euglena gracilis, Spinacea oleracea, Pisum sativum, Oryza sativa*) conține secvențe omoloage genelor **rpoA**, **rpoB** și **rpoC**, de la bacteria *Escherichia coli*. Secvențele omoloage lui **rpoC** sunt reprezentate de două gene **rpoC**$_1$ și **rpoC**$_2$. Secvențele aminoterminale ale proteinelor codificate de **rpoC**$_1$, de la orez și porumb, sunt aproape identice. Omologia de secvență dintre genele cloroplastice **rpoC**, printre monocotiledonate și dicotiledonate, variază între 70% și 96% și aceste gene codifică pentru subunități ale ARN polimerazei cloroplastice.

ARN polimeraza cloroplastică de la porumb este o enzimă multimerică, cu 5 subunități de 69, 60, 55, 34 și 15Kda. Există și factori de transcripție care au specificitate pentru ARN polimeraza cloroplastică. Un asemenea polipetid a fost desemnat factorul S. Acesta este implicat în transcrierea anumitor gene cloroplastice, cum ar fi gena **rbcL**, încorporată în vectori de expresie de tip bacterian.

După expunerea la lumină a frunzelor de porumb, în cursul înverzirii, se acumulează o proteină tilacoidală de 32 Kda, al cărei mesaj este purtat de un ARNm specific și traductibil. Acest ARNm hibridizează cu „**fotogena plastidială 32**“ care codifică pentru această proteină a tilacoidelor , fiind o genă fotoreglabilă, adică este reglată prin factorul lumină. Această genă este localizată în fragmentul 8 BamH I al ADNcl de porumb și ea nu este exprimată nici în proplastide și nici în etioplaste, fiind însă transcrisă masiv într-un ARNm specific, după inducția la lumină.

La porumb, gena **rpoC1** este localizată în aval de gena **rpoB** și codifică un polipeptid de 78Kda, având o identitate de secvneță de 62 – 92% cu gena **rpoC1** cloroplastică de la alte specii. Produsul său (subunitatea ARN polimerazică cloroplastică) are 36% omologie de secvență cu primii 600 de aminoacizi ai subunității b' a ARN polimerazei de *E. coli* (tabel 6).

Tabel 6. Genele plastidiale de la porumb și produșii lor

Gena/proteina	Mărimea proteinei (presupusă)-Kda	Mărimea proteinei (estimată din gel)-Kda	Omologie de secvență cu E. coli
RpoA/Rpoa	39	38	26%
rpoB/Rpob	121.6	120	37,5%
rpoC1/Rpob'	78.3	78	36.2%
rpoC2/Rpob"	176.1	180	27,6%

Ar putea exista și alte subunități ale ARN polimerazei cloroplastice echivalente factorului **σ**, codificate de gene nucleare sau plastidiale. Deși subunitățile ARN polimerazei la **E. coli α, β, β'** formează un singur tip de miez enzimatic **$\alpha_2\beta\beta'$**, nu este clar dacă subunitățile ARN polimerazei cloroplastice **$\alpha\beta\beta'\beta''$** formează unul sau mai multe tipuri de miezuri enzimatice (de exemplu **$\alpha_2\beta\beta'\beta''$** sau **$\alpha_2\beta\beta'$** sau **$\alpha_2\beta\beta''$**).

Echipamentul cloroplastic de inițiere a traducerii pare similar cu cel de la *E. coli*, deoarece secvențele complemetare ale diferitelor tipuri de ARNm cloroplastic cu capetele 3' ale ARNr 16S de la cloroplastele de porumb, tutun și *Euglena* sunt similare cu cele de la *E. coli*.

Ribozomii cloroplastelor sunt foarte asemănători cu ribozomii bacteriei *Escherichia coli*, ca structură și sensibilitate la antibiotice (cloramfenicol, streptomicină, eritromicină și tetraciclină). Secvențele de nucleotide ale ARNr de la cloroplaste de și de la *E. coli* sunt foarte asemănătoare, iar ribozomii cloroplastelor pot utiliza ARN$_t$-uri bacteriene în sinteza proteinică, în sisteme **in vitro**. Sinteza proteinică în cloroplaste începe cu N-formilmetionină, ca la bacterii, și nu cu metionină, ca în citosolul celulei eucariote. Spre deosebire de ADN nuclear, ADNcl poate fi transcris de enzima ARN polimeraza de *E. coli*, spre a produce ARNm cloroplastic ce poate fi tradus eficient de sistemul acelular de sinteză proteinică de la *E. coli*.

4.5. PROCESUL DE ARN-EDITING ÎN CLOROPLASTELE PLANTELOR SUPERIOARE

Editing ARN este un proces ce produce diferențe în secvența nucleotidică între un ARNm matur și matrița ADN corespunzătoare și care asigură sinteza unui polipeptid funcțional.

În cazul plastidelor plantelor superioare au fost evidențiate numai conversii Citozina – Uracil.

Editarea este o etapă foarte timpurie în exprimarea genelor plastidiale care poate precede splicing-ul și clivajul moleculelor de ARNm.

Editarea ARN din cloroplaste pare să fie restrânsă la plantele superioare (Tracheophyta) și poate fi subiect pentru modulările specifice de țesut și specifice stadiului de dezvoltare. Analizând mutanta ***Albostrians*** de orz, care nu are ribozomi plastidiali, s-a observat că ARN editing este un proces independent de traducerea cloroplastică. Semnificația biologică a procesului de editing a ARN a fost demonstrată prin introducerea unui situs de editare de la spanac în genomul plastidial de la tutun. Lipsa capacității de editare pentru acest situs, în plastidele de tutun, duce la un fenotip mutant (deficient fotosintetic).

Procesele de editing ARN în plastide sunt caracterizate prin:

- crearea de codoni de inițiere pentru traducere, așa cum se întâmplă în mai mulți codoni interni ai ARNm;
- restaurarea codonilor pentru resturile de aminoacizi conservați;
- editarea are loc la nivelul codonului secundar, cu excepția unui singur eveniment de editare descoperit în primul codon (gena **ndhB**: CAU în UAU).

Tranzițiile posibile ale codonilor se petrec cu frecvențe diferite, frecvență mare pentru Ser în Phe, Ser în Leu și Pro în Leu, și frecvență mică pentru Ala în Val, Thr în Ile. Există gene ale căror ARN este editat, dar există alte gene ai căror produși de transcripție nu sunt editați (genele **rpoA**, **rpoC1**, **petD** și **rps4**, de la porumb).

Nu există corelație directă între filogenia angiospermelor și modelul de editare al transcriptelor plastidiale, dar există diferențe în modelul de editare al transcriptului **psbF/L** între *Oenothera* și *Pelargonium* și între *Nicotiana* și *Antirrhinum*.

Un exemplu de editing ARN cu specific de țesut/organ, din plastide, a fost descoperit la spanac, la care transcriptul **psbF/L** din rădăcini și din semințe are ambele situsuri numai parțial editate. În plastide și toate celelalte țesuturi și stadii de dezvoltare editarea este completă.

Biochimia reacției de editare este necunoscută până în prezent. Dezaminarea citidinei la uridină pare a fi o explicație plauzibilă. Carcteristicile procesului de editare menționate mai sus sugerează un factor situs-specific care conferă specificitate reacției de editare. Natura acestui factor rămâne confuză.

4.6. MUTAțIILE GENOMULUI CLOROPLASTIC

Mutațiile în ADN cloroplastic apar spontan sau sunt induse de agenți mutageni chimici, fizici sau biologici, prin transformarea plastidială sau mutație inserțională. Ele se mai numesc mutații plastomice. Uneori, mutații ale genelor nucleare afectează și genomul cloroplastic. Mutantele cloroplastice se manifestă cel mai adesea prin modificarea culorii frunzelor care devin galbene sau albe sau de culoare intermediară între acestea două, verde deschis sau crem. Cel mai adesea, ele prezintă fenomenul de variegare, adică de alternanță a sectoarelor verzi cu sectoare galbene sau albe pe frunze.

Una dintre genele nucleare ale unui mutant variegat de *Arabidopsis thaliana*, alelică pentru locusul cloroplast mutator (CHM), afectează primar genomul mitocondrial și în mod secundar genomul cloroplastic.

Efectele fenotipice ale mutantelor cloroplastice sunt reprezentate de: rezistența la ierbicide, rezistența la antibiotice a celulelor vegetale în culturi și deficiențe în reacțiile de lumină și de întuneric ale fotosintezei, fotosistemului I și II. Menținerea și propagarea mutantelor plastomice sunt asigurate de formele variegate (verde-alb/verde-galben) ale plantelor. Sectoarele albe ale acestor plante găzduiesc numai mutante plastidiale, fiind incapabile de creștere autotrofică. Ele ar fi letale dacă ar fi în stare „homotalică“ (echivalentul stării de homozigoție din Genetica nucleară-mendeliană). În cazul plantelor himere – „heterotalice", supraviețuirea țesutului alb este asigurată de țesutul verde adiacent, din care difuzează metaboliții esențiali, pe care plastidele mutante nu îi pot sintetiza.

La *Hordeum vulgare*, mutația plastomului desemnată ***albostrians***, ce conduce la deficiențe în ribozomii cloroplastici, prin care este blocată sinteza proteinică cloroplastică, afectează totodată și sinteza ADNcl.

La *Euglena gracilis*, au fost evidențiate procese de reparare a leziunilor din ADNcl, induse sub acțiunea UV. În acest caz, fotoreactivarea este foarte eficientă. Enzima de fotoreactivare este codificată, după toate probabilitățile, de ADN nuclear. Se presupune că există și un sistem de reparare la întuneric.

Rezistența la ierbicide are la bază mutații de sens greșit din ADN cloroplastic și anume din gena **psbA** care codifică proteina D_1 a complexului fotosistemului II. Substituția unei singure perechi de nucleotide, conduce la modificarea codonului unui aminoacid. Cea mai expusă la asemenea mutație este poziția 264 care, la tipul sălbatic este ocupată de serină. Acest codon este modificat în direcții diferite, ceea ce conduce la substituții diferite de aminoacizi prin tranziție, devenind codon pentru Treonină, Glicină sau Alanină. În culturi celulare de *Chenopodium rubrum* s-au indus mutante rezistente la metributin, la nivelul genei **psbA**, în regiunea în care se află aminoacizii 219–272 ai proteinei D_1. Experiențele efectuate în culturi celulare de tutun au condus la izolarea de mutante de rezistență la antibiotice precum streptomicina și lincomicina. Mutațiile acestea se produc în genele cloroplastice pentru ARNr 16S și 23S. S-au identificat și mutații în gena cloroplastică **rps12**, care codifică pentru proteina ribozomală S_{12}, asemenea mutații exprimându-se fenotipic prin rezistență la streptomicină.

În tabelul 7 sunt prezentate unele mutații din genomul cloroplastic.

La *Antirrhinum majus* au fost descrise forme variegate, reprezentând mutante cloroplastice spontane care au afectate genele fotosistemului I. Astfel, mutanta **en:alba-4** prezintă substituția unui nucleotid în codonul 136 al genei **psaB**. Acesta codifică pentru apoproteina P700 A_2, aflată în centrul de reacție al fotosistemului I. Transversia TA – GC schimbă codonul TAT (UAU, în ARNm), care codifică pentru Tirozină, în codonul nonsens TAG (UAG, în ARNm), care determină o terminalizare prematură a sintezei polipeptidului, împiedicând formarea unui complex fotosistem I funcțional. Mutanta plastomică **en: alba 4** are afectat fotosistemul II, în care gena **psbD** suferă mutație printr-o tranziție CG-AT, ceea ce are drept urmare

Tabel 7. Unele mutații din genomul cloroplastic.

Rezistența	Gena cloroplastică	Mutația
streptomicină	rrn 16S	G→A (1012)
		A→C (1137)
		C→U (1139)
		G→A (1140)
		G→A (1133)
streptomicină	rrn 16S	C→U (472)
		C→A (860)
		C→U (codon 90)
	rps 12	C→T (codon 88)
		A→G (2032)
lincomicină	rrn 23S	G→A (2058)
		A→G ()
		A→G (2059)

schimbarea codonului Prolinei (CCT) cu codonul Serinei (TCT). Proteina D_2 împreună cu proteina D_1 intră în centrul de reacție (partea principală) al fotosistemului I.

Pentru identificarea mutațiilor în genele genomului cloroplastic a fost elaborată metoda SSCP (***Single Strand Conformation Polymorphisms*** – polimorfisme conformaționale ale monocatenelor), bazată pe faptul că monocatenele ADN iau conformații de structuri secundare (**conformers**), prin împerecheri intracatenare. Când asemenea monocatene diferă chiar printr-un singur nucleotid, ele formează conformeri diferiți care au un pattern de migrare diferit, în gel nedenaturant de poliacrilamidă. Combinată cu tehnica PCR, această metodă a permis identificarea mutantelor plastomice de *Antirrhinum majus*, prezentate mai sus.

Cel mai apropiat echivalent pentru cloroplaste al mutantelor „**petite**" de *Saccharomyces cerevisiae* sunt mutantele de *Euglena* care, deși conțin plastide, nu realizează fotosinteză. Asemenea mutante „**albino**", incolore, de *Euglena gracilis*, pot trăi dacă sunt crescute pe substraturi cu sursă de carbohidrați. Blocarea dezvoltării cloroplastelor la plantele superioare are efect letal. O asemenea situație apare atunci când plantele verzi sunt ținute timp îndelungat la întuneric sau când acționează agenți mutageni care distrug ADN cloroplastic.

Mutații de deleții din ADNcl au fost evidențiate la plante nefotosintetizatoare parazite precum *Epiphagus virginiana* și *Conopholis americana* (Orobanchaceae). **E. virginiana** are un ADN plastidial de numai 71Kb, fiind *cel mai mic genom plastidial de la plantele terestre* (Pamphilis și Palmer, 1990). La porumb, genomul cloroplastic are 156Kb. Genomul plastidial de la *E. virginiana* a pierdut genele fotosintezei precum și unele gene **ndh**, care codifică pentru constituienți ai lanțului respirator. La *C. americana* au fost, de asemenea, pierdute genele fotosintezei, pe când genele ribozomale plastidiale 16S și 23S sunt transcrise și produșii de transcriere procesați în mod normal. Genele **rpo** plastidiale nu sunt funcționale la această specie (Taylor, 1991; Wimpee, 1991, 1992).

Pierderea preferențială a genelor fotosintezei, dar păstrarea genelor sistemului genetic la plantele nefotosintetizatoare, sugerează ideea că genele sistemului genetic al plastidelor au rol **housekeeping** pentru viața celulei plantei ca întreg, și de aceea sunt reținute în celulă, dincolo de procesele de fotosinteză.

4.7. ASPECTE FILOGENETICE

Analiza comparativă a secvenței ARNr 16S de la cianobacterii și ADNcl de la cloroficee, feoficee și rodoficee a arătat că rodoplastele algelor roșii nu sunt chiar atât de înrudite cu cianobacteriile, precum se credea, iar ADN al feoplastelor algelor brune este relativ apropiat de ADNcl al plantelor superioare, ca mod de organizare și funcționare a genelor (Giovanonni, 1988).

ARN_t din plastide este diferit de ARN_t din mitocondrii și ARN_t din citosol. La **Euglena** au fost identificate peste 25 de gene pentru ARN_t cloroplastic. Genele ARN_t sunt redundante. O mare parte dintre ele se află în vecinătatea promotorilor pentru ARNr din ADNcl, așa cum este cazul ARN_t^{Ile} și al ARN_t^{Trp}, la *Euglena*. Gene ARN_t^{Ala} și ARN_t^{Ile} se află în cadrul operonului pentru ARNr, la algele *Chlorella* și *Chlamydomonas sp.* clusteri de gene pentru ARN_t se află în regiuni IR din ADNcl, la multe alge și plante superioare.

Datele de biologie moleculară susțin ipoteza că rodoplastele și cloroplastele au pornit evoluția pe linii diferite, din cianobacterii. La baza originii plastidelor din feoficee (alge brune), crisoficee (alge flagelate cu pigment brun) și diatomee este considerată o algă roșie unicelulară de tip *Porphyridium curentum*. Rata de evoluție a secvențelor codificatoare din ADNcl este mult mai redusă decât aceea a genelor nucleare, din care cauză, conservatorismul de secvență al genelor și al proteinelor cloroplastice în regnul vegetal este pronunțat.

Similitudinele dintre genomurile cloroplastice și cele bacteriene sunt izbitoare. Secvențele reglatoare de bază, precum promotorii și terminatorii transcripției sunt virtual identici, la cele două sisteme. Secvențele proteinice codificate de ADNcl sunt clar recunoscute ca fiind bacteriene, existând mai mulți clusteri genici cu funcții înrudite, cum ar fi cei pentru proteinele ribozomale, care sunt organizați asemănător în genomul cloroplastic al bacteriei *E. coli* și al cianobacteriilor.

Datele de biologie moleculară și celulară permit să se tragă următoarele concluzii:

1) cloroplastele superioare au derivat din bacterii fotosintetizante;

2) genomul cloroplastic a fost menținut stabil, pentru cel puțin câteva sute de milioane de ani, considerând timpul estimat de la divergența mușchilor de pământ și a plantelor superioare;

3) multe gene din genomul bacteriei originale se află în sistemele biologice actuale în genomul nuclear, unde au fost transferate și stabil menținute.

La plantele superioare, două treimi din cele aproximativ 60 de proteine ribozomale cloroplastice sunt codificate de nucleul celular, deși aceste gene au origine bacteriană clară, iar ribozomii cloroplastici au păstrat proprietățile lor originale de ribozomi bacterieni.

Există unele gene structurale majore în genomul cloroplastic, precum gena **psbA** care codifică proteina D_1, cu localizare tilacoidală, și care este implicată în organizarea sistemului fotosintetic II. Această genă a fost întâlnită și în genomul cianobacteriilor. La alga flagelată, monocelulară, *Chlamydomonas reinhardtii*, această genă se află în ADNcl, în două exemplare, localizate în regiuni cu repetiții inversate (IR). La alga brună

Dictyota dichotoma, gena **psbA** există într-un singur exemplar și nu are localizare IR.

Gena **psbB** codifică pentru proteina 51Kda asociată cu clorofila *a*. Ea este strâns lincată cu genele **psbA, psbC** și **psbD** care sunt transcrise într-un ARNm policistronic, atât la **D. dichotoma**, cât și la plantele superioare.

Elementele reglatoare ale regiunii promotoare a acestor gene prezintă similitudini cu cele ale promotorilor procariotici. Experimental, promotorii **psbA** pot funcționa în bacterii, cianobacterii și asociați cu ADN nuclear din plante superioare (**Nicotiana**).

CAPITOLUL XLIV

FLUX GENIC INTERGENOMIC ÎN CELULELE EUCARIOTE

În sistemele biologice actuale, genele implicate în construcția și funcția mitocondriilor și cloroplastelor sunt împărțite între ADN nuclear și ADN din organite. Mai mult încă, aceeași genă poate fi localizată în genomul nuclear la unele specii și în genomul organitelor, la alte specii. De exemplu, gena care codifică subunitatea 9 a complexului ATPază este mitocondrială, la **Saccharomyces cerevisiae**, și nucleară, la fungi și om. Această situație este consecința traficului considerabil de secvențe ADN (fluxul de gene) realizat în cursul definitivării, desăvârșirii sistemelor biologice eucariote, trafic care mai continuă chiar și în sistemele biologice actuale. Bunăoară, enzima esențială a fotosintezei, **ribulozo 1,5–bifosfat carboxilaza/oxigenaza** este un heteromultimer compus din 8 subunități identice mari (L) și 8 subunități identice mici (S). La eucariotele fotosintetice, L este codificată de gena **rbcL**, din genomul cloroplastului, pe când S, asemănător majorității polipetidelor cloroplastice, este codificată de gena **rbcS**, din genomul nuclear. Și totuși, la protoctistul cu cianele **Cyanophora paradoxa**, atât L cât și S sunt codificate de către genomul extranuclear care este cantonat în cianelă, o structură asemănătoare cloroplastului, tipică însă cianobacteriilor. Această localizare este în deplin acord cu originea endosimbiontică a cloroplastelor celulelor eucariote fotosintetizatoare: probabil, în strămoșul comun al eucariotelor fotosintetice actuale, un segment de ADN, în care exista și gena S, s-a deplasat din endosimbiont, sau derivatul acestuia, în ADN nuclear. Schimbul intergenomic este dovedit și de constatarea că genomul nuclear de la spanac conține secvențe (probabil necodificatoare) care reasociază cu probe clonate ce reprezintă aproape întregul ADN cloroplastic, incluzând secvențe din **rbcL**. Interesant apare faptul că secvențe omoloage **rbcL** și altor părți din ADNcl apar în cadrul ADNmt al unor plante. Unele dintre aceste secvențe apar a fi consecința transferului recent, de vreme ce ADNmt al unor specii este mult mai asemănător cu ADNcl al acelorași specii, decât cu al altor specii. De aici, s-a dedus că segmente de ADN clorplastic se pot deplasa spre nucleu și spre mitocondrii. Există numeroase alte exemple de transfer de secvențe de ADNmt, care fac posibilă reasocierea între ADN nuclear și segmente de ADNmt, la o diversitate de organisme, precum drojdiile, lăcustele, aricii de mare și șobolanii. Aceasta ne arată că aranjamentele cromozomale nu se limitează doar la genomul nuclear și că ele nu sunt barate de membranele organitelor sau anvelopa nucleară. Din păcate, nu sunt cunoscute mecanismele prin care se realizează un asemenea transfer de material genetic între nucleu și oganite sau **viceversa**.

Situații diferite de inactivare a genelor mitocondriale și de activare a corespondenților lor nucleari, consecință a translocației unei singure secvențe într-o specie ancestrală, într-o etapă timpurie a evoluției, s-au evidențiat la reprezentanții familiei Fabaceae.

La *Oenothera berteriana*, evenimentul de transfer al genei unei proteine ribozomale desemnată **rps12** a făcut ca în genomul mitocondrial al acestei plante să rămână doar un fragment al genei, proteina ribozomală mitocondrială fiind codificată de o genă localizată în genomul nuclear. Secvența țintă mitocondrială extinde direct un cadru deschis citirii, ca o presecvență, pe când, la leguminoase, un intron separă secvența țintă a cadrului de citire **cox II**, din regiunea reală de codificare. Alte gene mitocondriale transferate ca fragmente genice, precum și cadre deschise fracturate sau netranscrise, au fost observate în genomurile mitocondriale ale diferitelor specii. Astfel este cazul genelor **nad 7**, la *Marchantia polymorpha*, **rps13**, **rps19** și **rps14**, la *Arabidopsis thaliana*, **cox III**, la *Selaginella elegans*, **rps19**, la *Oenothera berteriana*, și **rps13**, la *Triticum aestivum*.

Activarea și expresia corectă a unor asemenea gene mitocondriale integrate necesită numeroase schimbări. Secvența nucleară trebuie să corespundă secvenței mitocondriale editate și oricare dintre intronii originali din compartimentul mitocondrial trebuie eliminat, spre a se obține un produs proteinic funcțional. Acest lucru se poate realiza pornind de la molecule mature de ARNm din organit, la care ***splicing***-ul și ***editing***-ul sunt complete. După integrarea acidului nucleic reverstranscris în genomul nuclear, trebuie adăugate presecvențe corespunzătoare la cadrul deschis citirii, spre a ținti produsul proteinic pe când, în organit sunt cerute semnale corecte de expresie, pentru transcripție și translație, spre a se exercita o modulare cantitativă.

Genomul cloroplastic apare a fi extrem de stabil în configurația sa actuală, acesta prezentând doar unele diferențe minore în conținutul informațional al diferitelor specii, în toată seria vegetală. Datele de hibridizare moleculară indică prezența de secvențe cloroplastice în genomurile nucleare, în diferite locuri. Un asemenea exemplu de transfer de secvențe din genomul cloroplastic în genomul nuclear îl oferă algele *Dasycladaceae*, la care gena pentru sinteza timidilat kinazei, are localizare nucleară, la *Acetabularia* și localizare cloroplastică la *Batophora*, localizarea primară fiind cea cloroplastică, pe când aceea nucleară este derivată. Tot astfel, la spanac, prin hibridizare moleculară, au fost identificate în ADN nuclear, până la șase copii ale genomului cloroplastic. Absența aparentă a unor secvențe străine în genomul cloroplastic al plantelor superioare este consecința absenței unor situsuri disponibile, în care aceste secvențe să se poată integra, fără a produce o mutație letală, dar totodată și consecința constanței remarcabile pe care o prezintă organizarea acestui genom.

În ceea ce privește calea transferului informațional interorganitic în direcția endosimbiontică, adică dinspre genomul mitocondrial spre genomul nuclear, studiile efectuate la arici de mare, lăcuste, drojdii și om au indicat existența unor fragmente cu localizare aparent randomică de ADN mitocondrial în ADN nuclear. La lăcuste, un fragment genic cu porțiunea 3' a subunității ribozomale mari mitocondriale și secvențele flancatoare asociate se află repetat de un număr mare de ori în ADN nuclear. Homologia cu secvențele mitocondriale originale este de peste 90%. La **Saccharomyces cerevisiae**, se află integrate în genomul nuclear secvențe genice mitocondriale reprezentând o parte a genei ribozomale **var1**, capătul 3' al genei citocromului b și o porțiune a secvenței **ori/rep**. Aceste fragmente sunt strâns lincate în ADN nuclear, dar rearanjate în ordinea lor relativă. Interesant apare faptul că această regiune este flancată de o parte și de alta de elemente **Ty**, despre care se știe că se mișcă în tot genomul, pe calea intermediarilor ARN și reverstranscripției, înainte de a se inserționa în noi locații genomice. Genomul nuclear uman conține un fragment de ADN mitocondrial cu un terminal 3' al genei pentru ARN ribozomal mic, apoi gena pentru

ARN_t^{Val} și secvența aproape integrală a genei pentru ARNr, fracția ARNr mare. La ariciul de mare, s-a evidențiat integrarea în ADN nuclear a fragmentului 3' al genei pentru ARNr mare și, posibil, întreaga genă pentru subunitatea I a citocromoxidazei.

Exportul de informație genetică din mitocondrii în nucleu a fost dovedit la mai multe specii de plante și este reprezentat de regiuni necodificatoare de câteva sute de nucleotide, dar și de gene întregi. Fragmente intronice mitocondriale sunt inserționate în amonte sau în aval de secvența genică a genelor nucleare pentru glucanaza acidă și bazică, de la tutun, fără a se știi care este rolul acestor fragmente de ADNmt, în cadrul secvențelor genice nucleare. În amonte de gena lectinei, de la o varietate de fasole africană, este inserționat un fragment intronic, dar în acest caz se știe că el conferă acestei gene specificitate de țesut, în expresia sa, în semințe. Acesta este un exemplu tipic al duplicării unei secvențe capabile de a specifica o funcție complet diferită de contextul inițial în care ea a existat. Tot la leguminoase, s-a evidențiat deplasarea genei **cox II** din mitocondrii în compartimentul nuclear, dar numai la mazăre este întâlnită o genă mitocondrială activă **cox II**, pe când la soia se întâlnește o asemenea genă mitocondrială în nucleu, ea fiind completă ca secvență și activă, pe când copia sa master din mitocondrii este inactivă, astfel că produsul activ al său este realizat prin funcționarea copiei nucleare, producerea sa în ribozomii din citosol și transferul acestuia din citoplasmă în mitocondrii. La o altă specie de mazăre, gena mitocondrială este complet pierdută, rămânând o singură genă **cox II**, cu localizare nucleară și, evident, activă.

Toate aceste evenimente de transfer de secvențe informaționale din mitocondrie în nucleu par a fi fost desfășurate cu mult timp în urmă, de vreme ce secvențele omoloage nucleare și mitocondriale au suferit o considerabilă divergență, mutația afectând numeroase poziții în secvența lor de nucleotide.

La plantele superioare, doar la porumb a fost identificată, prin studii de hibridizare, omologia dintre plasmidul mitocondrial (episom) S_1 și un segment corespunzător din ADN nuclear. Transferul de secvențe în decursul evoluției este sugerat de diferite complemente genice codificate în genomurile mitocondriale ale diferitelor specii actuale. Subunitatea **alpha** a ATPazei este codificată în genomul mitocondrial al plantelor, dar este specificată de gene nucleare, la toate celelalte specii. Cel mai clar exemplu îl oferă gena pentru subunitatea 9 a ATPazei, la fungi filamentoși. Acest polipeptid este sintetizat în mitocondrii la *Saccharomyces*, pe când la *Aspergillus* și *Neurospora*, acesta este sintetizat în ribozomii din citosol. Dar, și aici este aspectul interesant al problemei, ultimele două specii conțin o pseudogenă în ADN mitocondrial, care aparent nu este exprimată, reprezentând o secvență inactivată, după transferul său din genomul nuclear.

Multe, dacă nu majoritatea altor gene introduse în celula ancestrală de către progenitorul/progenitorii mitocondriali au fost încorporate probabil în genomul nuclear, în cursul evoluției celulei, ca de exemplu subunitățile complexelor citocromoxidazei și NADPH dehidrogenazei, codificate de gene nucleare.

Transferul de informație genetică din plastide în mitocondrii se întâlnește evident doar la organismele vegetale, în ale căror celule sunt identificate aceste două tipuri diferite de organite citoplasmatice. De altfel, planul de organizare a mitocondriilor și cloroplastelor este asemănător (fig. 1), ceea ce face eficient și funcțional transferul de gene din cloroplaste în mitocondrii. Acest transfer informațional interorganitic a fost și mai este încă desfășurat pe scară largă. Cercetările de hibridizare moleculară evidențiază din ce în ce mai multe fragmente de ADN cloroplastic integrate în ADN mitocondrial. Cel mai mare fragment contiguu de ADN cloroplastic, identificat până în prezent, în ADN mitocondrial, este o regiune de 12Kb din ADN cloroplastic, invers repetată, de la porumb, descrisă pentru prima dată ca exemplu de omologie de secvență cloroplastico – mitocondrială. Acest fragment are 12Kb lungime și conține întreaga genă pentru ARNr 16S, secvențele flancatoare din amonte cu ARN_t-uri (pentru Alanină, Izoleucină, Valină și Leucină) și o secvență adiacentă de 1,9 – 2,7Kb, cuprinzând una sau două gene codificatoare de proteine, printre care, subunitatea mare a RuBPCazei (Rubisco) și o secvență de 2Kb care codifică în genomul cloroplastic capătul 3' al ARNr 23S, 4,5S și 5S și ARNt-urile pentru Arginină, Asparagină și Glicină.

Transferul unor secvențe din ADN cloroplastic în ADN mitocondrial se poate realiza prin interacțiunea directă a acestor organite asociată cu fuziune și recombinare intermoleculară. Dar există și posibilitatea ca să rezulte fragmente de ADN cloroplastic, în urma lizei cloroplastului, fragmente ce pot traversa membranele mitocondriale, realizând, în fapt, transformarea mitocondriilor. Totodată, nu poate fi exclusă apriori, posibilitatea

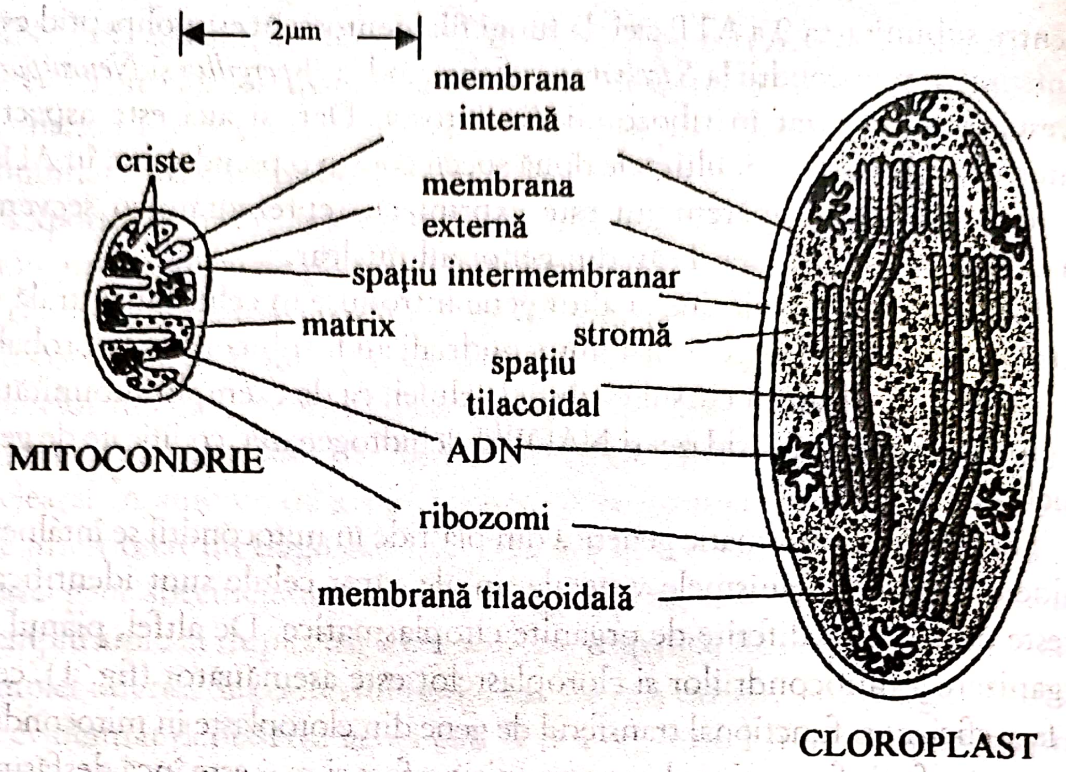

2μm
membrana internă
criste
membrana externă
spațiu intermembranar
matrix
stromă
spațiu tilacoidal
MITOCONDRIE
ADN
ribozomi
membrană tilacoidală
CLOROPLAST

Fig. 1 — Comparația dintre mitocondrie și cloroplast: cloroplastul este mult mai mare decât mitocondria și conține membrane tilacoide și spațiu tilacoid. Membrana internă a mitocondriei este pliată și formează criste. (din Singer și Berg, 1991)

intervenției unui vector capabil de a transfera material genetic din cloroplaste în mitocondrii. Această secvență, sau doar o parte a ei, este prezentă și în genomul mitocondrial de la grâu. O a doua parte a repetiției inversate din genomul cloroplastic, întâlnită în mitocondrii, conține partea 3' a genei pentru ARNr 23S, spațiatorul transcris, ARNr 4,5S, spațiatorul transcris interpus și, la porumb, de asemenea, gena pentru ARNr 5S, cu o parte a secvenței din aval, codificatoare de ARN_t^{Arg}. Numeroase gene pentru ARN_t, derivate din ADNcl, au devenit gene esențiale în mitocondriile de *Oenothera berteriana*. Mitocondriile de *Oenothera* conțin o mai mare parte a genei ARNr 23S decât la porumb, situată într-un fragment de 2081 perechi de nucleotide, pe când, la porumb acesta are doar 1270pb lungime. Numai că omologia dintre secvențele cloroplastice și cele mitocondriale este anulată exact înaintea genei pentru ARNr 5S. Transferul a avut loc de multă vreme, secvența cloroplastică evoluând divergent și acumulând diferențe în poziția nucleotidelor, față de secvența mitocondrială integrată.

Secvența din ADN cloroplastic, care codifică pentru subunitatea mare a ribulozo bifosfatcarboxilazei, a fost identificată în genomul mitocondrial al multor specii de plante superioare. Genomul mitocondrial de la porumb, de exemplu, conține partea majoră a acestui cadru deschis citirii. Traducerea secvenței mitocondriale în celule de *Escherichia coli* conduce la sinteza unui polipeptid trunchiat, ce poate fi precipitat cu anticorpi împotriva subunității mari.

Datele de hibridizare moleculară indică prezența secvenței pentru subunitatea **β** a ATPazei cloroplastice în mitocondriile de **Phaseolus aureus**. Molecula lineară de ADN mitocondrial S_1, de la porumb, conține un segment de 420pb, omolog cu gena proteinei asemănătoare lui „32Kda", a centrului de reacție a fotosistemului II (**psbA**). Această secvență conține un număr de duplicații scurte, atunci când se compară cu secvențele cloroplastice, reminiscente amprentelor elementelor transpozabile.

În genomul mitocondrial de la *Oenothera sp.*, *Brassica oleracea*, *Zea mays* etc. au mai fost identificate secvențe genice de origine cloroplastică, pentru proteina ribozomală **rps4**, pentru ARN_t-uri pentru prolină, triptofan, histidină, unele având inserții de câte cinci nucleotide în bucla T, ceea ce le face nefuncționale, deoarece asemenea inserții distorsionează structura moleculei ARN_t.

În ARN_t citoplasmatic din linia **T cms** (androsterilă) de porumb se află o parte a ARN_t^{Arg} din cloroplaste, la terminalul 3' al unei gene de fuziune specifice **cms**. Omologia aceasta trebuie că a derivat din evenimente de recombinare intramitocondrială, deoarece o asemenea secvență este întâlnită și în ADNmt, din cadrul unui fragment cloroplastic, cu ARNr 23S – 4,5S – 5S aflat într-o poziție în spatele ARNr 5S, analog genomului cloroplastic.

ARN_t^{Trp} reprezintă singurul exemplu clar de secvență cloroplastică funcțională, transferată în genomul mitocondrial al plantelor, ceea ce denotă că o asemenea direcție de transfer de secvențe informaționale nu a apărut la un nivel relevant al secvențelor integrate. Cadrele de citire cu omologie la subunitățile NADPH dehidrogenazei indică suficientă similitudine structurală cu corespondenții lor mitocondriali, spre a oferi o corelație fermă, dar totodată sunt suficient de diferiți, spre a exclude o relație evolutivă recentă, între aceste gene aflate în două compartimente celulare diferite.

Nu există dovezi privitoare la transferul unor secvențe din genomul nuclear în cel cloroplastic dar, dată fiind această „promiscuitate“ genetică evidentă, din cadrul celulei eucariote, este hazardant a se trage o concluzie fermă în acest sens, câtă vreme se cunoaște secvența completă a genomului cloroplastic la trei specii de plante, dar nu există o cunoaștere integrală a secvenței genomului nuclear, la aceste trei plante.

În ceea ce privește transferul dinspre nucleu spre mitocondrii, cel mai bine definit exemplu este cel al unui fragment de ADN ce conține o parte a genei pentru ARNr 18S, integrat în ADN mitocondrial, de la *Oenothera*. O întindere de 620 nucleotide prezintă peste 90% identitate de secvență cu gena nucleară ce codifică pentru ARNr 18S și conține un segment de expansiune de 160 nucleotide, prezente doar în moleculele de ARNr 18S de la eucariote și care sunt absente din ARNr de la procariote, din mitocondrii și din cloroplaste.

De asemenea, o potențială secvență de origine nucleară, întâlnită la aceeași specie și înrudită cu fragmentul nuclear pentru ARNr 18S, este un cadru deschis citirii cu omologie semnificativă cu reverstranscriptele întâlnite a fi asociate cu elemente transpozabile eucariote și retrovirusurile. Cea mai mare omologie este observată cu reverstranscriptul (RT) elementului transpozabil 17,6, de la *Drosophila*, ceea ce sugerează o origine a acestui cadru de citire prin transfer de la un element transpozabil din compartimentul nuclear, fapt susținut de semnale pozitive de hibridizare cu ADN nuclear de la plante. Această secvență informațională a putut penetra în compartimentul mitocondrial ca element transpozabil, care ulterior s-a inserționat în genomul mitocondrial. Și la variantele **kalilo** de **Neurospora crassa** se descrie un caz de transfer de forma unui element transpozabil de 9,0Kb, în situsuri preferențiale, în cursul senescenței.

La alga crizofită **Ochromonas danica** s-a descris o cross- marcare cu anticorpi împotriva subunității mici a Rubisco, codificată nuclear, a unei proteine cloroplastice, dar marcajul apare și în mitocondrii. Neexistând date privind secvența de nucleotide, nu se poate trage nici o concluzie fermă asupra eventualității unui transfer nucleu – cloroplast și nucleu – mitocondrie.

Transferul acestor secvențe informaționale s-a realizat ca fragmente de ADN dublu-catenare. Deși membranele externe ale mitocondriilor sunt structural diferite, microscopia electronică a evidențiat ocazionale confluențe ale acestor structuri, bază a continuității posibile dintre asemenea organite care ar putea asigura transferul de molecule de ADN. Uneori, mitocondriile ajung încarcerate în cloroplaste, situație în care este posibil contactul fizic dintre cele două genomuri distincte, urmată de recombinare între moleculele de ADNmt și ADNcl. Sunt unele cercetări (Gavrilă, 1986, 1987) care au evidențiat modificări majore în structura membranelor cloroplastelor și în cursul fuziunii acestor organite din cadrul unui proces parasexual pe care l-au descoperit la *Euglena terricola*. Această descoperire poate aduce o explicație procesului de recombinare de gene cloroplastice, precum și posibilității de transfer de gene între cloroplaste și mitocondrii, în situațiile în care asemenea organite se angajează în realizarea unui asemenea proces de parasexualitate.

Plasmidele și elemente similare pot media transferul de secvențe de ADN la bacterii și nu este exclus ca mecanisme analoage să fie funcționale și la eucariote, în transferul de material genetic între organitele celulei. Această ipoteză are și o fundamentare faptică, având în vedere existența unor elemente extracromozomale ce se observă frecvent în mitocondriile plantelor superioare, ca plasmide liniare sau circulare ADN sau ARN, sau ca părți de genom mitocondrial, generate în unele din numeroasele evenimente de recombinare. Dar, singurul exemplu de plasmide potențial transferate din nucleu în mitocondrii este întâlnit în cazul variantelor **kalilo** de *Neurospora crassa*.

Încercarea de a transforma mitocondriile in vivo cu secvențe ADN clonat nu a reușit. Dar transferul de ARN din citoplasmă în mitocondrii este nu numai de subînțeles, pe baza semiautonomiei acestora și parțialei dependențe a lor de genomul nuclear, dar și dovedit în cazul algei *Chlamydomonas* și al ciliatului *Tetrahymena*, al căror genom mitocondrial nu poate codifica suficiente tipuri de ARN_t, fiind nevoite să le importe din genomul nuclear, via citoplasmă. Primaza mitocondrială de la mamifere necesită ARNr 5,8S codificat nuclear pentru desfășurarea activității sale. O enzimă de procesare mitocondrială la om conține, în afară de componenta proteinică, importată din citoplasmă, cel puțin o moleculă de ARN de 135 nucleotide care este codificată de o genă nucleară. Importul de ARN în mitocondrii este continuu, deoarece activitatea enzimatică a acestei endonucleaze este esențială pentru replicarea genomului mitocondrial.

În mitocondrii există și o RNază asemănătoare RNazei P de la bacterii, care este dependentă de ARN.

Elementele genetice transpozabile pot fi implicate în procesele de transfer informațional între organitele celulei eucariote.

Cadrul deschis citirii cu înaltă omologie cu genele reverstranscriptazei, întâlnit în genomul mitocondrial de la *Oenothera*, ar putea avea o asemenea activitate de reverstranscriere în mitocondrii, oferind secvențe informaționale derivate din intermediari ARN. Derivarea reverstranscriptazei din elemente transpozabile nu poate fi exclusă.

Gruparea secvenței nucleare pentru ARNr 18S cu două regiuni din genomul cloroplastic cu cadrul de citire ce prezintă înaltă omologie cu genele reverstranscriptazei din genomul mitocondrial de la **Oenothera**, ar putea sugera cotransferul și cointegrarea acestor secvențe.

Integrarea secvențelor informaționale se poate realiza prin modele diferite: integrare randomică, recombinare cu specificitate de situs, recombinare omoloagă.

Deoarece majoritatea genelor care codifică proteinele mitocondriale și cloroplastice se află în nucleul celular al celulelor eucariote actuale, se pare că, în cursul evoluției celulei eucariote, a avut loc un transfer masiv de gene din organite în ADN nuclear. Numai așa se poate explica de ce unele gene nucleare care codifică proteine mitocondriale sunt asemănătoare genelor bacteriene. Astfel, secvența de aminoacizi a enzimei superoxiddismutazei din mitocondriile de găină seamănă mai mult cu enzima bacteriană superoxiddismutază, decât seamănă ea cu enzima corespunzătoare, din citosolul aceleiași celule eucariote. Unele secvențe necodificatoare din ADN nuclear par a fi de origine mitocondrială recentă, fiind integrate în genomul nuclear, ca ADN „**junk**“.

Se pare că mitocondriile sunt descendenții unui tip particular de bacterie fotosintetică purpurie care pierduse capacitatea de a realiza fotosinteză, păstrând doar pe aceea a lanțului respirator. Nu se știe dacă toate mitocondriile au derivat dintr-un singur eveniment endosimbiontic. Dar, având în vedere faptul că mitocondriile protozoarelor au trăsături distincte, iar unele sunt suficient de diferite de mitocondriile din celulele vegetale și din celulele animalele, există argumente pentru a se putea susține originea separată a mitocondriilor din celula protistelor, față de cele din celulele vegetale și din celulele animale. Mitocondriile neobișnuite ale tripanosomelor sunt un argument în susținerea unei asemenea idei.

Se pune o întrebare logică: de ce mitocondriile și cloroplastele au genomuri proprii, distincte, pe când alte organite aflate în aceiași citoplasmă a celulei eucariote precum aparatul Golgi (dictiozomii), peroxizomii și lizosomii nu au genomuri proprii? Menținerea unui sistem genetic separat este foarte costisitoare: peste 90 de proteine (proteine ribozomale, aminoacil – ARN_t sintetazele, ADN și ARN polimeraze, enzime pentru procesarea și modificarea ARN trebuiesc codificate de către genomul nuclear. Secvențele de aminoacizi ale celor mai multe dintre aceste enzime din mitocondrii și cloroplaste diferă de acelea ale omoloagelor nucleare și citosolice. Astfel, nucleul trebuie să asigure cel puțin 90 de gene pentru susținerea sistemului genetic al fiecărui organit. Sunt multe lucruri încă neclarificate, printre care și „de ce trebuie ca proteinele sintetizate în mitocondrii și cloroplaste să fie produse în aceste organite și nu în citosolul acelei celule?“

Se poate ca sistemele genetice ale organitelor celulei eucariote să reprezinte un capăt înfundat al evoluției, ceea ce înseamnă că procesul prin care, potrivit ipotezei endosimbiozelor succesive, endosimbionții și-au transferat cea mai mare parte a genelor lor în nucleu să fie stopat, înainte ca acesta să fie complet. Transferul ulterior a fost anulat în cazul mitocondriilor, datorită modificărilor recente în codul genetic mitocondrial care au făcut ca genele mitocondriale să devină nefuncționale, dacă ar fi fost transferate în nucleu.

Mitocondriile și cloroplastele se divid prin diviziune binară în cadrul unui proces coordonat, controlat atât de genomul organitului cât și de genomul nuclear. Cele mai multe proteine ale acestor organite sunt codificate de gene nucleare, sintetizate în citosol și apoi importate individual în organit. Unele proteine ale acestor organite și unele tipuri de ARN ale lor sunt codificate de gene localizate în ADN-ul organitului și sintetizate în organit. Genomul mitocondrial uman are aproximativ 16.500 perechi de nucleotide și codifică 22 tipuri de ARN_t și 13 catene polipeptidice diferite. Genomurile cloroplastice sunt de aproximativ 10 ori mai mari decât cele mitocondriale și conțin aproximativ 120 de gene. Organitele sunt parțial funcționale în număr normal chiar și în mutante care sunt lipsite de un genom funcțional al organitului, ceea ce demonstrează importanța covârșitoare a nucleului pentru biogeneza atât a mitocondriilor cât și a cloroplastelor. Ribozomii cloroplastelor seamănă cu cei bacterieni, pe când ribozomii mitocondriilor prezintă deopotrivă asemnări și deosebiri cu cei bacterieni, ceea ce face dificilă interpretarea originii lor. Similitudinile proteinelor sugerează că ambele organite s-au diferențiat atunci când o celulă eucariotă primitivă a intrat în relații ensimbiontice stabile cu organisme procariote libere și aerobe, deschizând calea celei mai mari aventuri a vieții pe Terra, finalizată cu apariția organismelor pluricelulare și încoronată apoteotic cu geneza celui ce gândește singur — OMUL.

CAPITOLUL XLV

FINGERPRINTING GENETIC-MOLECULAR SAU AMPRENTAREA ADN PENTRU IDENTIFICAREA DE PERSOANĂ

1. PRINCIPII GENERALE

Până acum două decenii, cercetarea genetică a diferitelor cazuri specifice medicinei legale s-a făcut prin analiza markerilor serologici clasici. Pentru aceasta s-au folosit grupele sanguine, sistemul HLA, proteinele polimorfe și enzimele, cercetate prin metode imunologice sau electroforetice. Acești markeri genetici nu au dat niciodata rezultate suficient de concludente, mai ales în cazurile în care probele analizate erau în cantități minime sau erau degradate, fapt des întâlnit în medicina legală. În plus, în afara analizei sângelui, celelalte probe, cum ar fi părul, saliva sau sperma, nu puteau fi analizate decât limitat.

După o perioadă inițială de dispute (și inexactități științifice) (*Lewin, 1989; Lander, 1989; Norman, 1989*), amprentarea ADN a devenit bine implementată în științele medico-legale (*Lander și Budowle, 1994; Roberts, 1992; Benecke, 1995*). În momentul în care poliția a recunoscut valoarea analizelor ADN, materialul biologic examinat a provenit din sângele total, din pete de sânge, din cantități minuscule de epiteliu, fire de păr, oase și spermă uscată. În contrast cu sângele total utilizat în testele de paternitate, petele biologice de la locul unei crime sunt deseori expuse la radiații UV, umiditate și degradare. În plus, clinicienii au început să supună analizelor, țesuturi care au fost păstrate ani de zile în parafină. O problemă în toate aceste cazuri este aceea că, în funcție de condițiile de conservare, ADN este de obicei rupt în fragmente mai mici (fragmentarea este singura modalitate relevantă de degradare), iar în laborator pot fi prelucrate doar cantități mici de ADN.

Descoperirea polimorfismului în segmentele repetitive ale ADN, de către *Jeffreys* și colaboratorii săi, în anul 1985, a avut însă un impact major asupra medicinii judiciare, aceștia punând bazele identificării de persoană, prin amprenta genetică, mai exact prin testul ADN. În ultimii 10 ani, au fost descoperite sisteme de tipizare ADN foarte robuste și cu un mare potențial informativ. Aceasta a crescut la maximum posibilitatea individualizării oricărui material biologic de origine umană.

Tipizarea (amprentarea) ADN are mult mai multe avantaje decât analiza tradițională a proteinelor, în primul rând pentru că oferă mai multe informații, iar sursa de ADN poate fi reprezentată de materiale biologice degradate și în cantitate foarte mică, deoarece ADN este mai rezistent la degradare decât proteinele. În plus, același genotip ADN poate fi obținut din orice țesut (de ex. sânge, salivă, spermă, păr, piele, oase etc), pe când analiza markerilor proteici se limitează la celulele care exprimă aceste proteine. În prezent, *analiza ADN a devenit o metodă standard în practica medico-legală*, fiind utilizată în majoritatea laboratoarelor, în scopul rezolvării cazurilor de criminalistică (analiza petelor de material biologic și a părului) pentru identificarea de persoană.

Toate genele umane sunt codificate de aproximativ 10-20% din genomul uman. Astfel, cea mai mare parte (80-90%) a genomului uman conține regiuni "non-codificante", care nu conțin informație genetică cu semnificație directă pentru sinteza proteinelor. Variabilitatea genetică este relativ limitată în ADN codificant, cu excepția regiunilor HLA. Aceasta se datorează faptului că genele care se exprimă sunt supuse presiunii selecției pe parcursul evoluției, în sensul că trebuie să-și mențină funcțiile specifice. Spre deosebire de acestea, părțile "non-codificante" ale genomului nu pot fi controlate de presiunea selecției, astfel că mutațiile din aceste regiuni sunt reținute și transmise la descendenți, provocând o semnificativă creștere a variabilității genetice. De aceea, aceste regiuni fiind foarte diferite de la un individ la altul, sunt foarte utile pentru investigațiile din genetica medico-legală, având o valoare informativă mare (*Schneider, 1997*).

O proporție importantă din ADN "non-codificant" (30%) conține secvențe repetitive, care pot fi incluse în două clase: secvențe repetitive în tandem (**"tandemly repetitive sequences"**) și elemente dispersate (**"interspersed elements"**). Majoritatea sistemelor de tipizare ADN aflate în uz curent se bazează pe analiza locilor cu secvențe repetitive în tandem. Asemenea secvențe se află în ADN satelit, iar din punctul de vedere al geneticii medico-legale, cele mai interesante sunt regiunile de ADN repetitiv mai scurte decât cele întâlnite în ADN satelit. Aceste regiuni pot fi clasificate în "minisateliți" (1) și "microsateliți", sau repetiții scurte în tandem (**"short tandem repeat"** - *STR*) (*Litt și Lutz, 1989*).

Minisateliții, denumiți și loci VNTR (**"variable number of tandem repeats"**) (*Nacamura* și colab., *1988*) sunt formați din 15-50 bp lungime, care se repetă în tandem pe lungimi de 500 bp-20 kb. STR sunt mult mai scurte. Unitatea repetitivă variază între 1 și 6 bp, care se repetă pe o lungime de 50 bp, până la 500 bp. În plus, minisateliții și STR diferă prin distribuția lor în genomul uman și, probabil, prin funcțiile lor biologice. Astfel, minisateliții sunt mai frecvent întâlniți în regiunile subtelomerice, pe când STR sunt larg răspândiți în întregul genom uman cu o frecvență de 1 locus pentru fiecare 6-10 kb (*Beckman și Weber, 1992*). Originea variabilității acestor regiuni pare să fie și ea diferită. Variabilitatea microsateliților își are originea în crossing-over inegal și uneori în conversia genelor (*Jeffreys și colab.*, *1994*), iar aceea a STR, în erorile de replicație (*"replication slippage"*) (*Di Rienzo și colab.*, *1994*).

Variabilitatea genetică dintre indivizi, cu privire la VNTR și STR, se bazează pe numărul diferit al elementelor repetitive, însă are la bază și diferențele privind însăși secvența ADN, deoarece repetițiile pot avea mici diferențe în secvența lor.

2. ANALIZA MINISATELIȚILOR PRIN UTILIZAREA PROBELOR "MULTI-LOCUS" ȘI "SINGLE-LOCUS"

Inițial, pentru analizele genetice medico-legale au fost propuse probele "multi-locus". Amprentele ADN "multi-locus" se bazează pe similitudinea secvențelor ADN din interiorul secvențelor repetate în tandem, la majoritatea minisateliților umani. Astfel, probele ADN formate din repetiții tandem dintr-o secvență a acestor minisateliți, pot detecta (în condiții de relativ scăzută stringență de hibridizare), multiple fragmente variabile de ADN uman, prin Southern blot sau hibridizare, pentru a produce amprente ADN individual specifice.

În anul 1985, *Jeffreys* și colaboratorii săi au descris *prima amprentă ADN "multi-locus"* și au prezis că aceste modele individual-specifice pot constitui o metodă foarte valoroasă pentru identificarea individuală și pentru testele de paternitate. Probele "multi-locus" au fost, de asemenea, utilizate în cazuri judiciare dintr-o dispută de imigrație, iar ulterior, în cazuri de paternitate și criminalistică. Totuși, aceste probe "multi-locus" nu au avut succes în domeniul medico-legal din cauză că, deși erau valoroase sub aspect informațional, nu făceau posibilă evaluarea statistică a probelor în cazurile în care acestea trebuiau comparate, iar standardizarea ridica probleme serioase. Din aceste considerente, aceste probe au fost substituite cu analiza VNTR prin utilizarea probelor specifice de locus, în condiții de stringență ridicată.

Până la introducerea analizei STR prin PCR, analiza minisateliților cu probe "single-locus" a fost foarte populară în majoritatea laboratoarelor de genetică medico-legală. Încă și astăzi, acestea se utilizează în unele laboratoare, ele fiind utile pentru diferite scopuri. Probele cele mai des utilizate în Europa sunt MS43, MS31 și YNH24. În Europa, s-au depus eforturi considerabile pentru standardizarea analizelor cu probe “single-locus”. Ca rezultat al acestor eforturi, s-a obținut o armonizare precisă a rezultatelor, deși s-au utilizat metodologii diferite. Totuși, metodele statistice folosite pentru evaluarea informației conținute în profilurile ADN, sunt controversate.

Cel mai mare avantaj al analizelor cu probe “single-locus” este enorma variabilitate a unora dintre minisateliți. Dezavantajul însă, constă din timpul prea mare pentru efectuarea analizei și, mai ales, necesitatea folosirii unei cantități relativ mari de ADN nedegradat. Deoarece ADN extras din probele medico-legale este, în cele mai frecvente cazuri, degradat datorită condițiilor de mediu, aceste tehnici nu pot da rezultate suficient de concludente.

3. ANALIZA *STR* BAZATĂ PE *PCR*

Reacția de polimerizare în lanț (PCR) a depășit dificultățile de mai sus și a determinat creșterea spectaculoasă a utilității tehnicilor de amprentare ADN în științele medico-legale.

Majoritatea sistemelor de tipizare ADN bazate pe PCR permit identificarea alelelor ca entități discrete, evitându-se astfel problemele statistice care apar la compararea benzilor electroforetice, iar standardizarea a devenit mult mai simplă. Pe lângă creșterea sensibilității inerente oricărei tehnici PCR, devine mult mai probabil succesul analizei materialului vechi și degradat, deoarece mărimea mică a porțiunilor polimorfe de ADN analizat este foarte susceptibilă efectuării reacției PCR. După ce prin PCR a devenit posibilă generarea unui număr mare de copii ale segmentului ADN de interes, au apărut o serie de metode pentru detecția variației segmentelor amplificate. Deoarece se pot produce cel puțin 10^6 copii de secvență de interes, este posibil să se utilizeze pentru detecție, metode care nu folosesc izotopii. Pentru aceasta au fost aplicate mai multe metode.

Prima dintre acestea a utilizat probe de oligonucleotide specifice de secvență (SSO). Kitul AmpliType PM PCR (Perkin-Elmer, Foster City, Ca) este unul din cele mai folosite în laboratoarele de profil. Cu acest kit se amplifică în sistem multiplex locii HLA DQA1, LDLR, GYPA, HBGG, D7S8 și GC. Sistemul a fost validat pentru analizele medico-legale și este încă larg utilizat, deși multe laboratoare preferă astăzi sistemele STR mult mai informative, precum și alte strategii pentru analiza variantelor HLA.

Analiza secvențelor cu repetiții scurte în tandem (STR) prin utilizarea reacției PCR este astăzi metoda preferată pentru identificarea medico-legală. STR-urile dinucleotidice sunt cele mai comune STR-uri din genomul uman, ele fiind markerii genetici cei mai utilizați pentru analizele de linkage. Totuși, nu aceștia sunt cei utilizați în genetica medico-legală din cauză că aceste STR sunt afectate în cursul amplificării prin erori de replicare (**"strand slippage"**), ceea ce produce benzi artefactuale în electroforeză. Spre deosebire de acestea, repetițiile tetra și pentanucleotidice sunt mult mai puțin supuse acestor artefacte de replicare și de aceea sunt mult mai potrivite pentru studiile de amprentare ADN.

Datorită structurii lor, STR variază prin faptul că pot fi extrem de complexe, până la extrem de simple. STR complexe prezintă avantajul hipervariabilității. STR simple au avantajul unei foarte simple standardizări și al scăzutei rate mutaționale. Evenimentele mutaționale sunt mult mai frecvente în linia germinală masculină, această rată, pentru diferiți loci, putând varia cu mai multe ordine de mărime, structura și lungimea fiind factorii care o afectează cel mai mult.

Pe lângă caracteristicile menționate, selectarea STR ideale pentru scopurile medico-legale include analiza minuțioasă a bezilor artefactuale pe care le pot genera, precum și robustețea și mărimea lor. În general, dimensiunile scurte sunt preferabile deoarece mărimea produsului amplificat este critică la probele degradate în care fragmentele mici pot fi amplificate, iar cele mai mari, nu.

Un alt avantaj important îl constituie posibilitatea amplificării simultane a mai multor loci STR printr-o singură reacție de tip multiplex. Acesta, cuplat cu detecția directă a produșilor de amplificare pe gel de poliacrilamidă, face posibilă automatizarea amprentării ADN pe baza STR.

STR au fost pentru prima dată analizate prin folosirea sistemelor manuale de electroforeză. Pentru standardizare, sunt recomandabile gelurile de poliacrilamidă denaturante pentru că prin folosirea lor pot fi detectați și produși de amplificare generați de erori de replicare. Domeniul a fost revoluționat prin introducerea tehnicilor bazate pe evidențierea fluorescentă și prin utilizarea secvențiatoarelor ADN. Folosirea secvențiatoarelor permite realizarea unor reacții multiplex mari (cu peste10 sisteme STR).

Pentru tipizarea STR este esențială utilizarea **"ladder"**-ilor alelici cu secvența de referință. În general, acești **"ladderi"** alelici cuprind toate alelele unui sistem, deși, uneori, pot apare și alele intermediare la STR-urile mai simple. Pentru distingerea acestor alele intermediare există ghiduri de interpretare și astfel ele pot fi ușor implementate la sercvențiatoarele automate.

Există mai multe multiplexe disponibile comercial. Unul din cele mai cunoscute este sistemul SGM Plus (Perkin-Elmer), care cuprinde 10 loci: HUMFIBRA/FGA, HUMVWFA, HUMTH01, D18S51, D21S11, D6S477, D8S1179, D16S539, D19S433 și Amelogenina. Multiplexele produse de Promega (Madison, WI) sunt foarte utilizate mai ales în laboratoarele care folosesc sistemele electroforetice manuale și platforme de secvențiere monocromatice.

Deși au fost descrise sisteme de analiză STR foarte robuste, necesitatea standardizării a determinat concentrarea procupării majorității laboratorelor asupra sistemelor STR clasice. Ca exemplu, “Interpol Working Party on DNA Profiling”, recomandă pentru Europa, următorul set standard de 7 loci: VWAFA31/A, TH01, D21S11, FGA, D8S1179, D3S1358, D18S51 și amelogenina.

În general, puterea de discriminare combinată a STR este enormă, iar probabilitatea ca doi indivizi neînrudiți să fie identici este mai mică de 10^{-10}, pentru majoritatea multiplexelor existente.

4. ADN MITOCONDRIAL (*ADNmt*)

Analiza regiunii de control a ADNmt este o metodă eficientă pentru studiul și compararea provenienței oaselor, a ADN vechi și foarte degradat, si mai ales pentru analiza firelor de păr fără bulb. În aceste cazuri, variația ADNmt poate fi analizată prin mai multe strategii. Combinarea amplificării PCR cu secvențierea directă a ADN este de obicei ultima etapă pentru identificare, demonstrându-se reproductibilitatea sa în diferite cazuri de medicină legală. Deși analiza ADNmt este o metodă validă pentru genetica medico-legală, problemele cum ar fi rata mutațională, heteroplasmia și necesitatea pentru prelucrarea statistică, fac uneori dificilă interpretarea rezultatelor.

5. VARIAȚIILE CROMOZOMULUI Y

Polimorfismele specifice cromozomului Y s-au dovedit a fi foarte utile în identificarea medico-legală. Polimorfismele Y pot fi aplicate în testarea paternității când este investigat descendentul masculin al unui tată prezumptiv, precum și în diferite cazuri de criminalistică. De asemenea, analiza polimorfismelor Y este utilă pentru analiza fracțiunii de ADN masculin din probe amestecate de la ambele sexe, fapt des întâlnit în crimele sexuale (5-15% dintre cazurile de medicină legală).

Deși variabilitatea cromozomului Y este mică, regiunea non-pseudoautozomală conține diferite tipuri de secvențe polimorfe, cum ar fi: markeri bialelici, STR și minisateliți. Cele mai utilizate STR-uri Y sunt formate din repetiții trinucleotidice (DYS392) și tetranucleotidice (DYS19, DYS385, DYS389-I, DYS389-II, DYS390, DYS391 și DYS393).

Interpretarea statistică a cazurilor pentru coincidență, aceeași ca și pentru ADNmt, este mult mai complicată și necesită luarea în considerare a unor corecții adecvate în funcție de substructura populației de unde provin probele.

6. METODOLOGIA IDENTIFICĂRII DE PERSOANĂ PRIN ANALIZA STR CU SISTEMELE MULTIPLEX Promega (SUA)

Amprentele ADN clasice se pot obține din cel puțin 5-10 µg de ADN nedegradat. De aceea, tehnologia clasică nu poate fi utilizată pentru analiza petelor care conțin cantități de ADN mult mai mici și/sau ADN degradat. De exemplu, 1 ml de ejaculat conține 150-300 µg ADN, pe când dintr-un tampon vaginal recoltat post-coitum se pot extrage doar 0,01-3 ng de ADN. Un fir de păr smuls cu tot cu rădăcina conține până la 30 ng de ADN genomic, pe când un fir de păr fără bulb conține maximum 0,1 ng ADN. ADN degradat conține fragmente moleculare scurte. De aceea tipizarea ADN trebuie să utilizeze tehnici care permit detecția unor loci repetitivi scurți și, în același timp, să ofere informațiile necesare. Acești loci (STR) au fost descoperiți acum 12 ani, deci mai târziu decât debutul amprentării ADN.

Genomul fiecărei persoane conține sute de loci STR (numărul exact nu este încă cunoscut). S-a observat că fiecare locus are un număr limitat de alele posibile, în general de la cinci, la zece alele. Fiecare individ poate fi heterozigot sau homozigot pentru fiecare locus STR. Comparația alelelor unui individ cu alelele obținute dintr-o pată de sânge de la locul unei crime sau cu ale unui copil, permite determinarea identității sau paternității.

Locii STR sunt astăzi mijlocul primordial de analiză a petelor și de investigații criminalistice în lume. În Statele Unite, unde până în 1997 erau utilizați cu anumite restricții, cazul O.J. Simpson a demonstrat în mod impresionant utilitatea STR pentru tipizarea unor cantități mici de ADN.

Pentru a evidenția STR este necesar ca acești loci să fie amplificați prin PCR. Astăzi pot fi amplificați simultan până la 16 loci STR, folosindu-se primeri care detectează specific un anumit locus.

După separarea electroforetică a produșilor PCR, vizualizarea se face prin colorație argentică sau prin detecția fluorescentă semiautomatizată.

În rezumat, etapele tehnologice (metoda manuală de electroforeză) prin care trebuie trecută o probă biologică pentru tipizarea ADN pe baza analizei STR, sunt următoarele:

- extracția ADN din probele biologice;
- amplificarea probelor de ADN prin reacția PCR;
- relevarea alelelor amplificate prin electroforeză în gel denaturant de poliacrilamidă (evidențierea amprentei ADN);
- interpretarea statistică a rezultatelor.

7. EXTRACȚIA ADN DIN PROBELE BIOLOGICE

Înainte de efectuarea oricărui tip de testare, ADN trebuie izolat din celule sau resturi celulare sau chiar din orice material în care se poate afla el. Această operație trebuie executată cu mare grijă și meticulozitate. Procedurile de extracție sau izolare variază în funcție de materialul prezent în probă (de exemplu, sânge, spermă, salivă, păr etc.), de cantitatea de material din probă (ceea ce influențează tipul de test la care va fi supusă proba). Alegerea metodei este în funcție de inspecția vizuală, examinarea microscopică și testele disponibile.

Cantitatea de ADN necesară pentru determinarea completă a amprentei ADN cu sistemele STR nu depășește valoarea de 1-5 ng/µl. Astăzi există kit-uri special destinate pentru asemenea extracții, care permit izolarea ADN din cantități infime de probă biologică. De exemplu:

-un fir de păr fără bulb, conține aprox. 1 ng ADN
-un µl de salivă, conține aprox. 3 ng ADN
-un µl de sânge, conține aprox. 45 ng ADN
-un µl de spermă, conține aprox. 300 ng ADN
-un fir de păr cu bulb, conține aprox. 10-500 ng ADN.

Datorită lungimii mici a STR, reacția PCR pentru un singur sistem STR necesită doar 50 pg de ADN matriță (*Benecke, 1996*). Considerând că o singură celulă umană conține 6 pg de ADN, opt celule sunt suficiente pentru analiza ADN. În situații mai rare poate fi tipizată și o singură celulă (mai ales spermatozoidul).

În laboratorul nostru am evaluat mai multe metode de extracție a ADN necesar pentru amplificarea STR. Apreciem că kiturile produse de firma *Promega* (SUA), sunt cele mai performante.

Astfel, „Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit" permite izolarea rapidă și simplă a ADN dublucatenar din sânge total, culturi celulare și țesuturi animale, fără utilizarea solvenților organici. Procesul cuprinde trei etape. În prima etapă se efectuează liza celulelor, respectiv liza nucleilor. Pentru izolarea ADN din leucocitele sanguine, această etapă implică liza eritrocitelor, urmată de liza leucocitelor și a nucleilor lor. A doua etapă constă din îndepărtarea proteinelor prin precipitare salină în urma căreia ADN genomic rămâne în soluție. În final, ADN genomic este spălat și concentrat prin precipitare cu izopropanol. Din 300 µl de sînge se obține o cantitate de 5-15 µg de ADN genomic bicatenar, cu greutate moleculară mare, adică de lungime acceptabilă, pentru analize.

Un alt kit, produs tot de Promega, este „Promega DNA IQć System". Acest kit este foarte util pentru izolarea ADN din produsele biologice degradate sau aflate în cantități mici, specifice medicinei legale. Extracția cu acest kit presupune două etape importante. Pentru materialele biologice aflate pe un suport solid, prima etapă constă dintr-o extracție simplă rapidă și eficientă a materialului biologic de pe suport. Etapa a doua utilizează o rășină magnetică care leagă specific ADN, fără a fi necesară o spălare a probei pentru a se îndepărta reactivul de liză. În plus, prezintă avantajul că particulele nu se agregă în momentul în care sunt acoperite de ADN. Această metodă este utilă pentru purificarea rapidă a cantităților mici de ADN, aproximativ 100ng sau chiar mai puțin, și devine mult mai eficientă în cazurile în care probele conțin mai puțin de 50 ng ADN. Cantitatea de ADN extrasă prin folosirea unui protocol standard de izolare este limitată la cantitatea necesară unei reacții PCR pentru amplificarea STR, ceea ce rezolvă o problemă, de altfel dificilă, în cazul folosirii altor tehnici, și anume măsurarea cantității de ADN obținută dintr-o probă.

Trebuie să precizăm că ambele proceduri de extracție prezentate mai sus, prezintă o serie de adaptări și alternative pentru extracția ADN din diferite produse specifice, de exemplu, digestia firelor de păr sau a fragmentelor de țesuturi cu proteinază K.

8. AMPLIFICAREA PROBELOR DE ADN (REACȚIA PCR)

Procedura are rolul de a realiza amplificarea în milioane de exemplare a genelor care vor fi analizate pentru identificare. Deoarece ADN extras din probele biologice se află într-o concentrație foarte mică, el nu poate fi analizat. În plus, el conține toată informația genetică. Pentru amprentarea ADN, locii STR sunt amplificați prin folosirea primerilor specifici care sunt astfel concepuți încât permit desfășurarea reacției PCR, prin sistemul multiplex. Un sistem multiplex de analiză a locilor STR folosiți aproape standardizat în medicina legală, este „*GenePrint*® STR System" (Promega, SUA) cu ajutorul căruia se poate realiza amplificarea a 9 loci în trei reacții multiplex (câte 3 loci pentru o reacție). Sistemul este format din kiturile:

-CTT Triplex, care amplifică locii CSF1PO, TPOX și TH01;
-FFv Triplex, care amplifică locii F13A01, FESFPS și vWA;
-SilverSTR® III Triplex, care amplifică locii D16S539, D7S820 și D13S317

Tabelul 1 prezintă amănunte privind locii STR incluși în cele trei triplexuri (*GenePrint* STR Systems (Silver Stain Detection). Technical Manual. Promega Corporation, 2001).

TABEL 1. Informații cu privire la locii STR incluși în „GenePrint® STR System“ (Promega, SUA)*

Locusul STR	Localizare cromozomiala	Denumirea locusului în GeneBank si definitia locusului	Secvența repetitivă 5' →3'
SilverSTR® III Triplex			
D16S539	16q24-qter	Nu este specificat	AGAT
D7S820	7q11.21-g22	Nu este specificat	AGAT
D13S317	13q22-q31	Nu este specificat	AGAT
CTT STR Triplex			
CSF1PO	5q33.3-q34	HUMCSF1PO Proto-oncogena umană c-fms pentru gena receptorului CSF-1	AGAT
TH01	11p15.5	HUMTH01 Gena tirozin hidroxilazei umane	AATG
TPOX	2p25.1-pter	HUMTPOX Gena tiroid peroxidazei umane	AATG
FFv STR Triplex			
F13A01	6p24.3-p25.1	HUMF13A01 subunitate a genei factorului XIII de coagulare, uman	AAAG
FESFPS	15q25/qter	HUMFESFPS, proto-oncogena umană c-fes/fps	AAAT
vWA	12p12-pter	HUMVWFA31, gena factorului uman von Willebrand	AGAT

*) După: *GenePrint* STR Systems (Silver Stain Detection). Technical Manual. Promega Corporation, 2001

Locii incluși în aceste trei sisteme Triplex conțin alele clar separate, care diferă în lungime prin numărul de unități repetitive. Aceasta a permis construcția de **„ladderi“** alelici care conțin fragmente de aceeași lungime ca și alelele cunoscute pentru fiecare locus. Compararea vizuală între acești „ladderi" alelici și probele amplificate permite determinarea rapidă și precisă a alelei prezente în probă (Fig. 1)

Fiecare din cele trei sisteme Triplex din „*GenePrint*® STR System" conține perechile de primeri pentru fiecare locus , precum și „ladder"-ii alelici pentru acești loci. În reacția de amplificare se folosește de asemenea, tamponul specific de reacție și Taq polimerază standard.

Prepararea soluției de amplificare (PCR Master Mix) se face conform tabelului 2. Se multiplică volumul per probă (µl) cu numărul total al reacțiilor, pentru a se obține volumul final.

După repartizarea cantităților corespunzătoare de soluție „Master Mix" în fiecare tub de amplificare, cantitatea de ADN matriță (proba) care se adaugă, este un factor critic. Astfel, pentru CTT Triplex și pentru SilverSTR® III Triplex se folosește o cantitate de 1-5 ng ADN matriță pentru un tub de reacție de 25 µl, iar pentru FFv Triplex, 5-10 ng.

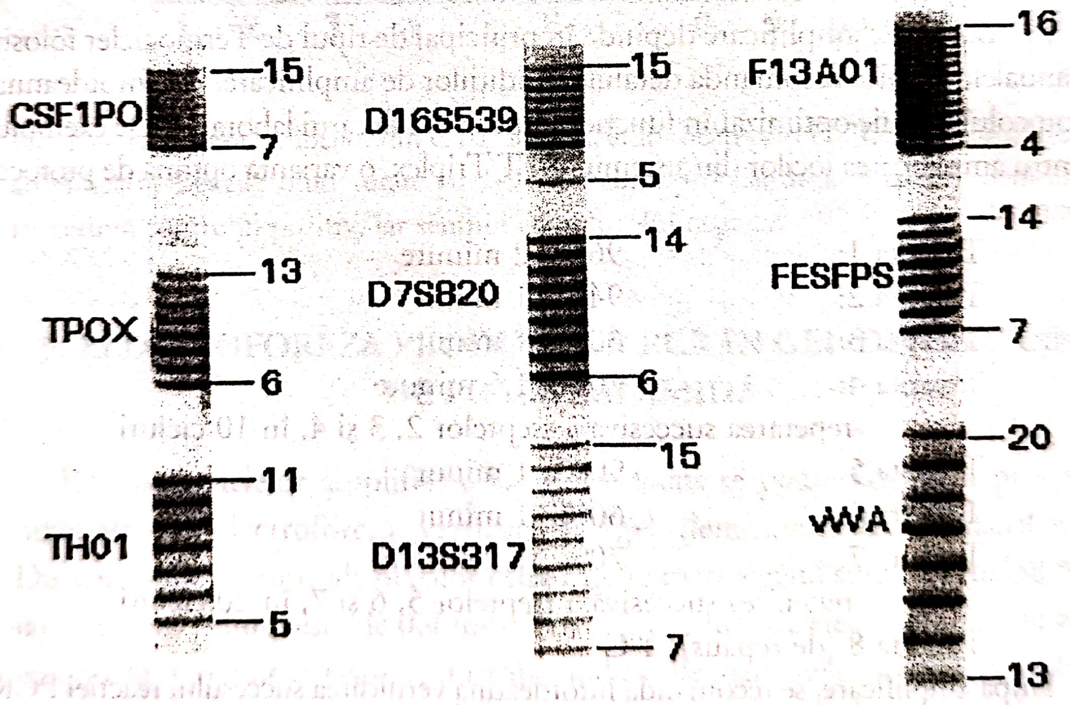


Fig. 1 — Probele cu „Ladder"-i alelici pentru cele trei sisteme Triplex. Migrarea s-a făcut în gel denaturant de poliacrilamidă 6%. Numerele din dreapta fronturilor de migrare reprezintă cel mai mare și cel mai mic număr de unități repetitive apărute în fragmentele corespunzătoare fiecărei alele prezente în populație.

TABEL 2. Prepararea PCR Master Mix, pentru 12 probe dintr-un STR Triplex

Componenta din PCR Master Mix	Volum per probă (µl)	Număr de reacții	Volumul final (µl)
Apă distilată fără nucleaze	17,35	12	208,2
Tampon STR 10X	2,50	12	30
Amestec de perechi de primeri Triplex 10X	2,50	12	30
Taq DNA Polimerază (la 5u/µl)	0,15 (0,75u)	12	1,8
Volumul total	**22,50**	**12**	**270**

Protocolul de amplificare depinde în principal de tipul de Termocicler folosit. Manualele tehnice recomandă detaliile condițiilor de amplificare, dar întotdeauna, protocolul trebuie optimizat în funcție de specificul fiecărui laborator. De exemplu, pentru amplificarea locilor din sistemul CTT Triplex, o variantă optimă de protocol poate fi:

Treapta 1: 96°C, 2 minute
Treapta 2: 94°C, 1 minut
Treapta 3: 60°C, 1 minut
Treapta 4: 70°C, 1,5 minute
-repetarea succesivă a treptelor 2, 3 și 4, în 10 cicluri
Treapta 5: 90°C, 1 minut
Treapta 6: 60°C, 1 minut
Treapta 7: 70°C, 1,5 minute
-repetarea succesivă a treptelor 5, 6 și 7, în 20 cicluri
Treapta 8 (de repaus): 4°C

După amplificare, se recomandă întotdeauna verificarea succesului reacției PCR. Această procedură, deși opțională, este totuși importantă, pentru că astfel se evită prelucrarea în continuare a probelor pentru electroforeza pe gel de poliacrilamidă dacă amplificarea a eșuat. Această verificare se face prin electroforeza produșilor PCR pe gel de agaroză 1-2% și colorare cu ethidium bromid. Observarea gelului se face la transiluminnator, la 302 nm (figura 2).

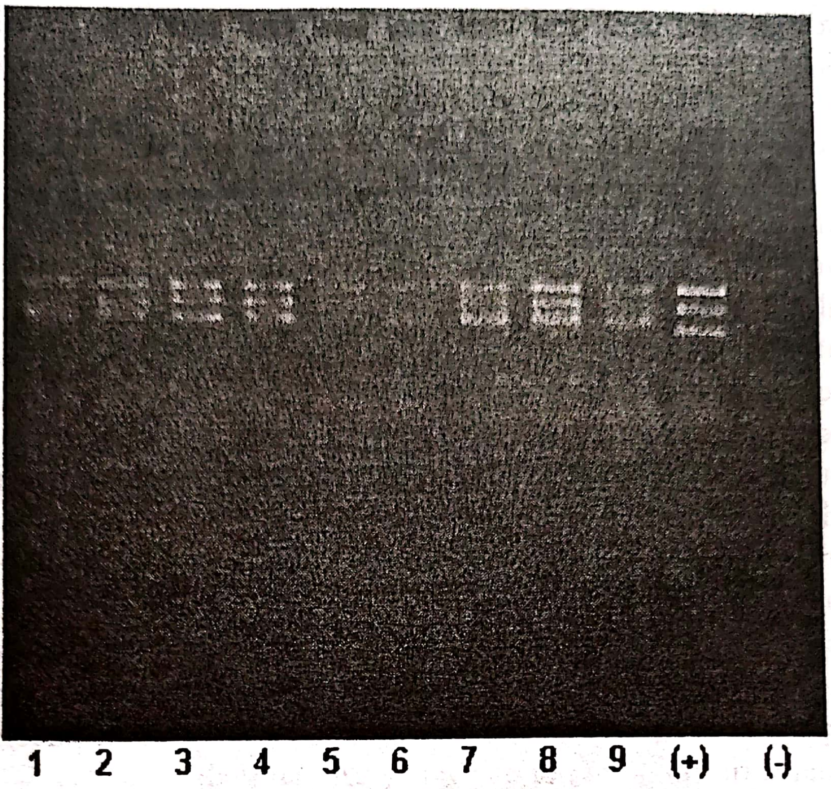


Fig. 2 — Electroforeza locilor din CTT Triplex, amplificați prin PCR. Se remarcă succesul amplificării. Benzile numerotate cu 1-9 reprezintă probele de la 9 cazuri. Semnul (+) reprezintă controlul pozitiv, iar semnul (-) controlul negativ.

9. ELECTROFOREZA PRODUȘILOR PCR ÎN GEL DENATURANT DE POLIACRILAMIDĂ

Relevarea alelelor amplificate la fiecare locus se poate face prin procedura manuală de electroforeză verticală în gel denaturant de poliacrilamidă. Dimensiunile optime ale plăcilor între care se toarnă gelul sunt: 31 cm/38,5 cm, iar grosimea gelului este de 0,4 mm. Toată procedura de electroforeză este foarte laborioasă și trebuie să respecte întocmai indicațiile manualelor tehnice de utilizare. Pentru succesul preparării gelului și deci pentru succesul electroforezei trebuie respectate anumite detalii de tehnică, din care amintim:

-Este recomandabilă utilizarea gelului 4% de poliacrilamidă pentru migrarea produșilor amplificați cu CTT Triplex și FFv Triplex, iar pentru SilverSTR® III Triplex se recomandă prepararea unui gel de poliacrilamidă 6%.

-Placa mare de electroforeză trebuie tratată cu o soluție (**Gel Slick®**) care previne lipirea gelului de aceasta, iar placa scurtă se tratează cu **„bind silane“** pentru a se facilita lipirea gelului de aceasta.

-Toate ustensilele de spălare și tratament al plăcilor trebuie păstrate separat pentru a se evita contaminarea plăcilor cu **„bind silane“**

-Cantitatea de soluție pentru gel care să fie suficientă pentru plăcile cu dimensiunile amintite mai sus este de minimum 75 ml.

-Tipul de „pieptene“ optim este cel cu „dinți de rechin“.

-Înainte de adăugarea agentului de polimerizare (amonium persulfat), se testează timpul de polimerizare cu un eșantion de soluție de poliacrilamidă. Acest timp trebuie potrivit la minimum 15-20 minute, deoarece, dacă acesta este prea scurt, apare riscul ca polimerizarea să se declanșeze înainte de terminarea turnării gelului. Timpul de polimerizare depinde de cantitatea de amonium persulfat.

În general, etapele de lucru pentru electroforeza în gel de poliacrilamidă a produșilor PCR, sunt următoarele:

1. Pregătirea plăcilor (spălarea, ungerea cu soluțiile de lipire și de detașare, suprapunerea și etanșeizarea plăcilor cu spațiatoarele, cleștii și banda adezivă;
2. Prepararea soluției de poliacrilamidă și agent denaturant (uree);
3. Testarea timpului de polimerizare (vezi mai sus);
4. Adăugarea agentului de polimerizare (amonium persulfat și TEMED);
5. Turnarea gelului;
6. Polimerizarea (60 minute);
7. Instalarea plăcilor pe aparatul de electroforeză;
8. Premigrarea (60 minute, pentru atingerea temperaturii de aprox. 50°C
9. Aplicarea probelor (3 μl/godeu);
10. Migrarea (90 minute la 1500-2000 V)
11. Dezlipirea plăcilor
12. Colorarea argentică.

În urma colorării argentice, gelul se lasă 24h la aer pentru a se usca și se poate citi la transiluminator în lumină vizibilă (Figura 3).

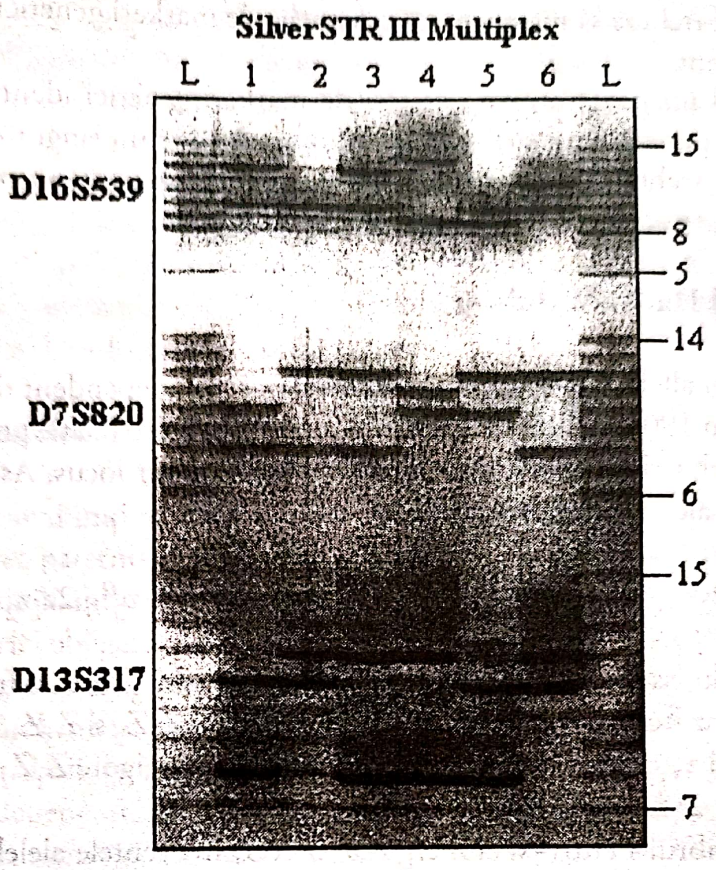


Fig. 3 — Un examplu de electroforeză a locilor din sistemul SilverSTR III System. Produșii de amplificare au fost separați pe gel denaturant de poliacrilamidă 6% și detectați prin colorare argentică. Fronturile de migrare notate cu L conțin o mixtură de „ladderi" alelici pentru locii STR. Numerele din dreapta imaginii indică cel mai mic și cel mai mare număr de unități repetitive pentru alelele fiecărui locus. Fronturile 1-6 reprezintă probele de ADN individuale.

10. EVALUAREA STATISTICĂ A TESTELOR ADN

Reguli genetice

Distribuția (segregarea) genotipurilor parentale în descendență depind de combinațiile între alelele părinților. În fiecare caz, aceasta se referă la un anume locus.

Legile lui Mendel au stabilit probabilitatea distribuției alelelor la descendenți, de aceea ele sunt utilizate pentru a genera patru reguli în atestarea paternității:

1. Copilul nu poate avea un marker genetic care este absent la ambii părinți.

2. Copilul trebuie să moștenească o pereche de markeri genetici, câte unul de la fiecare părinte.
3. Copilul nu poate avea o pereche de markeri genetici identici decât dacă ambii părinți posedă markerul respectiv, cel puțin într-un singur exemplar.
4. Copilul trebuie să aibă markerul genetic care este prezent independent la ambii părinți.

Echilibrul Hardy-Weinberg

Soarta unei allele într-o populație a fost descrisă independent de către Hardy și Weinberg, în 1908. Echilibrul Hardy-Weinberg indică o relație predictibilă între frecvența alelelor și frecvența genotipurilor la un singur locus. Astfel, suma (Σ) frecvenței a 3 alele (z_1, z_2, și z_3) este:

$$\Sigma = z_1z_1 . z_2z_2 . z_3z_3 . 2z_1z_2 . 2z_1z_3 . 2z_2z_3 = z_1^2 . z_2^2 . z_3^2 . 2z_1z_2 . 2z_1z_3 . 2z_2z_3.$$

De exemplu, să luăm în considerare alele Z_1, Z_2 și Z_3 care au frecvența z_1, z_2, și z_3. În acest caz frecvențele pentru genotipurile Z_1Z_1; Z_2Z_2 și Z_3Z_3, sunt respectiv, $z_1 . z_1$, $z_2 . z_2$, și $z_3 . z_3$, iar frecvența genotipurilor heterozigote Z_1Z_2, Z_1Z_3 și Z_2Z_3 este $2 . z_1 . z_2$, $2 . z_1 . z_3$ și $2 . z_2 . z_3$.

Dacă echilibrul Hardy-Weinberg este corect, frecvențele alelelor la un locus într-o populație, sunt constante de-a lungul timpului. Totuși există o serie de abateri de la echilibrul Hardy-Weinberg, care apar din diferite motive:

1. erorile de prelevare a probelor între generații mai ales în populațiile mici, numite sub termenul de drift genetic;
2. încrucișările între părinți înrudiți, numite *"non-random genetic drift"*, care duc la descreșterea heterozigoției;
3. migrația genelor de la o populație la alta, care modifică frecvențele și afectează echlilibrul Hardy-Weinberg, până ce se stabilește un nou echilibru;
4. mutațiile sau modificările alelelor moștenite, care afectează frecvențele;
5. selecția naturală, care poate crește frecvența unei alele în timp. Descendenții cu această allelă pot avea șansă mai mare de supraviețuire decît cei cu alte alele. De exemplu, deficiența G6PDH sau talasemia în ariile cu malarie.

Echilibrul de linkage

Echilibrul de linkage este conceptul prin care alelele de pe loci independenți pot fi dispersate în populație la fel ca într-un echilibru Hardy-Weinberg multilocus. Dacă locii sunt apropiați unul de altul, pe același cromozom, ei se află în echilibru genetic de linkage. La fel cum populațiile omogene pot atinge echilibrul Hardy-Weinberg, genele de pe același cromozom ating echilibrul în funcție de distanța genetică și de gradul de recombinare (rearanjare) dintre loci.

Pe de altă parte, în cazul în care se amestecă două populații care au loci diferiți, iar alelele lor au frecvențe remarcabil diferite, alelele asociate care nu sunt linkate genetic pot fi considerate ca fiind într-un licage statistic dezechilibrat. În practică, acest ultim tip de dezechilibru este dificil de demonstrat, la nivel populațional. Totuși, aceasta este posibil dacă se demonstrează la nivel individual, în cazul în care acești indivizi au fost recent introduși în populație.

Calculul testelor de paternitate

Funcția cea mai importantă a testelor de medicină legală, indiferent dacă este vorba de testarea paternității sau de identificare, este aceea de a exclude numărul maxim de posibili indivizi. În testele de paternitate aceasta se realizează prin identificarea alelei obligatorii și determinarea dacă tatăl posibil posedă această alelă.

Alela obligatorie este alela care în mod obligatoriu vine de la tatăl biologic. De exemplu, dacă mama este de tip AA, iar copilul este de tip AB, tatăl biologic trebuie să contribuie la copil cu alela B. Dacă nu este așa, este încălcată legea eredității mendeliene, mama considerându-se ca fiind sigur mama acestui copil. Dacă tatăl prezumptiv posedă alela B, fie în stare homozigotă (ambele alele B), fie în stare heterozigotă (alela B doar într-un singur exemplar), el nu poate fi exclus.

Dacă tatăl prezumptiv nu posedă alela B, el nu a avut cum s-o transmită la copil și de aceea este exclus de la paternitate. Singura excepție a unei asemenea situații ar fi dacă mutația alelei A în alela B, ar fi un eveniment relativ frecvent. Dacă mama este de tip AB, iar copilul este AB, atunci alele obligate sunt și A și B, iar tatăl poate contribui la descendență atât cu A, cât și cu B. Orice tată prezumptiv care posedă alelele A și B, nu poate fi exclus. Dacă însă tatăl prezumptiv este de tip C sau cu orice alt genotip non-A și non-B, el este exclus a fi tatăl biologic. Se observă în acest caz că există două alele obligatorii.

În situațiile în care tatăl nu poate fi exclus, se poate calcula gradul de posibilitate pentru ca el să fie tatăl adevărat. Acest grad de posibilitate (**„weight of the evidence“**) reprezintă șansa relativă ca tatăl prezumptiv să transmită la copil alela obligatorie, față de alți indivizi neînrudiți din populație.

Indicele de Paternitate (PI) reprezintă șansa relativă ca tatăl prezumptiv să transmită alela obligatorie, față de un alt individ neînrudit din populație. Indicele de paternitate este un „raport de probabilitate“, adică raportul dintre șansa tatălui prezumptiv de a transmite alela, versus alt individ din populație. Șansa ca tatăl prezumptiv să transmită alela obligatorie este determinată de legile lui Mendel.

Dacă tatăl este homozigot pentru alela obligatorie, adică posedă ambele alele obligatorii, probabilitatea de a transmite alela obligatorie este 1,0 (2/2).

Dacă tatăl prezumptiv posedă doar o copie a alelei obligatorii sau doar una din două alele obligatorii, probabilitatea de a transmite această alelă devine 0,5 (1/2). PI pentru un anume locus este probabilitatea cu care tatăl prezumptiv poate transmite alela, împărțită la frecvența alelei sau alelelor obligatorii. Astfel, PI poate fi sau 1/p sau 0,5/p, depinzând de numărul de alele obligatorii pe care le posedă tatăl prezumptiv. Dacă s-a determinat după mamă și copil că există două alele obligatorii, p se calculează după formula:

$$p = p_1 + p_2,\ \text{și SI va fi: } 1/(p_1 + p_2) \text{ sau } 0{,}5/p_1 + p_2).$$

PI se calculează pentru fiecare locus care este testat. Legile teoriei probabilităților determină cum se combină toate PI-urile, pentru a se determina probabilitatea combinată a paternității. Astfel se obține *Indicele de paternitate combinat (CPI)*

Indicele de paternitate combinat

Legile de combinare a probabilităților sunt foarte simple. În cazul în care ne interesează probabilitatea combinată a caracteristicilor A și B și C, atunci probabilitatea individuală a lui A, B și C se înmulțește. Dacă ne interesează doar probabilitatea combinată a lui A și a lui B, atunci probabilitățile individuale se adună. De aceea, probabilitatea ca tatăl prezumptiv să transmită la un copil, locusul 1*A, locusul 2*C și locusul 3*E, este produsul dintre probabilitatea lui 1*A x 2*C x 3*E. Prin multiplicarea tuturor probabilităților individuale se obține CPI. Pentru o baterie rezonabilă de teste, acest număr poate ușor depăși valoarea de 400 până la 1000. CPI stabilește astfel că tatăl prezumptiv este de 400 de ori, respectiv de 1000 de ori mai probabil ca el să fie tatăl biologic, decât un oricare alt bărbat neînrudit din aceeași populație. În Germania este acceptat un CPI de 1000, pe când în SUA, CPI poate fi mai mic de 1000. Deoarece majoritatea persoanelor interesate în determinarea paternității au puțin timp disponibil pentru a interpreta acest raport de probabilitate, se folosește o cale alternativă de prezentare a acestor date și anume, de a converti această rată de probabilitate într-o altă valoare numită probabilitatea de paternitate.

Probabilitatea de paternitate

Teorema lui Bayes estimează probabilitatea ca un eveniment să aibă loc, când acest eveniment nu poate fi măsurat direct. Această teoremă stă la baza matematicii Bayesiene care este utilizată în special în domenii cum ar fi sfatul genetic, pentru a se estima riscul unei femei de a naște un copil afectat. Formula de estimare ca un eveniment să aibă loc este următoarea:

$$\text{Formula Bayes} = \frac{X \cdot p}{X \cdot p + y(1 - p)}$$

unde X reprezintă probabilitatea ca evenimentul să aibă loc, y probabilitatea ca acesta să nu aibă loc, p este prima probabilitate pentru ca X să aibă loc, iar 1 – p este prima probabilitate ca acesta să nu aibă loc.

În cazul testelor de paternitate, X este probabilitatea combinată ca tatăl prezumptiv să fi transmis toate allelele obligatorii și constă din produsul tuturor valorilor de 0,5 sau 1 pentru fiecare locus, respectiv.

Unii statisticieni consideră că probabilitatea prioritară trebuie calculată prin împărțirea rezultatului obținut din numărul total al rezultatelor posibile, de exemplu, probabilitatea prioritară a unei singure aruncări de zaruri (jumătate de pereche de zaruri) este 1/6, pe când probabilitatea prioritară de a cădea stema, la aruncarea unei monezi, este de 1/2.

Deoarece testul de paternitate are doar două posibilități posibile - este sau nu este tatăl biologic - probabilitatea prioritară este 1 din două opțiuni posibile, adică 0,5, indicând că “prioritatea neutră“ poate fi prioritatea corectă. Dacă este folosită valoarea de 0,5 pentru prioritatea prioritară, formula se reduce la formula care se utilizează pentru CPI:

$$\text{Probabilitatea de paternitate } (p = 0.5) = \frac{1}{1 + (1 / \text{PI } [\text{CPI}])}$$

Probabilitatea paternității este probabilitatea ca tatăl prezumptiv să fie tatăl copilului. De aceea, dacă CPI este 400, probabilitatea ca tatăl prezumptiv să fie tatăl biologic este de 99,75%. Invers, probabilitatea ca tatăl prezumptiv să nu fie tatăl biologic al copilului este de 0,0025 sau 0,25%. Această ultimă valoare este 1 din 400, sau reciproca lui PI.

„Bărbatul întâmplător neexclus” (“Random Man Not Excluded - RMNE”)

Puterea testului de paternitate poate fi determinată prin calcularea valorii RMNE. Această valoare statistică este comparabilă cu frecvențele populaționale calculate pentru identificările din medicina legală. RMNE este proporția care poate contribui la toate alelele și de aceea nu poate fi exclusă sau poate fi inclusă greșit. Acest termen este utilizat pentru a descrie frecvența acelor indivizi care nu pot fi excluși prin șansă. Formula pentru RMNE al unui singur locus este:

$$p^2 + 2p\,(1 - p) \text{ sau, simplificat, } 1 - (1 - p)^2$$

RMNE combinat (CRMNE) este analog cu CPI, adică el este produsul valorilor individuale. Valoarea CRMNE este în mod normal foarte mică, de ordinul a 0,0025. Este mai ușor să ne referim la reciproca acestui număr (1 - CRMNE), care se referă la Probabilitatea de excludere. Deoarece “Probabilitatea de Excludere” poate fi confundată cu “Probabilitatea Paternității”, un termen mai puțin confuz este “Puterea de Excludere - PE”.

PE reprezintă probabilitatea de a exclude tatăl acuzat fals. Dacă se folosește ca probabilitate prioritară valoarea de 0,5, PE este de asemenea Probabilitatea Bayesiană de paternitate.

Pentru a evita confuzia dintre “Probabilitatea Paternității” derivată din modelul de ereditate, se poate face referire la “Probabilitatea Non-Exclusivă a Paternității” sau la “Probabilitatea Weiner a Paternității“ după cum au propus unii autori. “Probabilitatea Non-Exclusivă a Paternității” are unele avantaje față de probabilitatea standard a paternității.

Cel mai mare avantaj al acestei metode este acela că ea crește cu numărul de teste executate și este total analoagă cu frecvențele populaționale utilizate în identificările din medicina legală.

Probabilitatea tradițională a paternității (probabilitatea de transmisie a alelelor în paternitate) poate scade dacă tatăl prezumptiv este heterozigot și mama și copilul sunt de același tip heterozigot, iar alelele sunt de tip comun, astfel că $p_1 + p_2$ este mai mare de 0,5.

Calculul pentru populațiile mixte

Pentru calcularea indicelui de paternitate, este indicat a se utiliza frecvența populațională a tatălui prezumptiv și a mamei. Dacă tatăl prezumptiv sau mama provin în descendență dintr-o mixtură de două populații, cum ar fi români și africani, valoarea p utilizată trebuie să cuprindă frecvențele populaționale ale celor două populații, dacă acestea sunt disponibile. Pe de altă parte, dacă părintele chestionat este Italian și sunt disponibile doar date despre populația României, efectul asupra rezultatelor poate fi neglijabil. RMNE/RFNE este calculat cum am descris mai sus, în funcție de caz.

În realitate, aproape toate populațiile umane sunt amestecate într-o oarecare măsură cu alte populații, de-a lungul istoriei lor. Alelele specifice pentru Asia Centrală, Asia de Nord și Africa pot fi găsite și în populația europeană ca urmare a infuziei de gene de la mongoli sau imigranți asiatici, la fel cum sunt prezenți latinii africani în anumite populații. Nu trebuie efectuate acomodări speciale pentru aceste evenimente istorice, dacă ele sunt reprezentate în probele populaționale.

Dacă un subiect investigat nu este nativ de origine, ci turist, de exemplu din SUA, este bine să se utilizeze datele din SUA. Totuși, dacă datele specifice nu sunt disponibile, se pot crea mici erori datorită neutilizării datelor corespunzătoare, iar până în prezent, mărimea acestor erori cu privire la STR nu au fost încă publicate. Dacă structura populației în chestiune este cunoscută, se poate calcula o frecvență artificială, utilizând proporțional mărimea frecvențelor populației constituente.

Tabelul nr.3 prezintă un exemplu de examinare a paternității. Sunt prezentate pe coloane separate alelele determinate la mamă, copil și tatăl prezumptiv. Pe o coloană separată este înfățișată alela obligatorie, în funcție de prezența ei la tatăl prezumptiv. Coloana „p" prezintă frecvența populațională a fiecărei alele obligatorii bazată pe determinările proprii pentru România. RMNE este calculat prin utilizarea formulei de la subsolul tabelului. „X" este probabilitatea ca tatăl prezumptiv să transmită alela obligatorie la copil. „PI" este calculat după formula X/p.

Valorile combinate sunt prezentate în rândul de jos al tabelului și se calculează prin înmulțirea valorilor RMNE și respectiv PI pentru fiecare locus. Puterea de excludere este „(1 - RMNE combinat) x 100" și atinge valoarea de 99,996 %, iar probabilitatea de paternitate, [PI combinat/(PI combinat + 1)] x 100, are valoarea de 99,994%, valoare suficient de mare pentru a atesta paternitatea biologică a copilului.

TABEL 3. Exemplu de examinare completă a unei paternități

Loci	Mama		Copil		Alela obligatorie	Tatal prezumptiv		p	RMNE	X	PI
CSF1PO	10	12	10	12	**12**	12	13	0.3402	0.5646	0.5	1.4699
TPOX	8	11	9	11	**9**	8	9	0.1193	0.2244	0.5	4.1897
TH01	9	10	7	10	**7**	7	10	0.1276	0.2389	0.5	3.9194
D16S539	12	12	10	12	**10**	10	11	0.0471	0.0920	0.5	10.6087
D7S820	8	10	10	10	**10**	10	10	0.2654	0.4604	1	3.7674
D13S317	7	10	7	11	**11**	11	12	0.3094	0.5231	0.5	1.6159
F13A01	3,2	5	5	6	**6**	6	7	0.2821	0.4845	0.5	1.7727
FESFPS	10	10	10	11	**11**	11	12	0.3289	0.5497	0.5	1.5200
vWA	17	17	15	17	**15**	15	16	0.1255	0.2352	0.5	3.9851
Valori combinate									**4.2035E^{-5}**		**16738.6**
Puterea de excludere 99.996%											
Probabilitatea de paternitate 99.994%											

p = frecvența alelei obligatorii conform datelor proprii pentru România

RMNE = proporția de indivizi din populație care pot avea alela obligatorie și deci nu pot fi excluși $[p^2 + 2p(1 - p)]$

X = probabilitatea ca tatăl prezumptiv să transmită alela obligatorie

PI = indicele de paternitate = raportul dintre probabilitatea ca tatăl prezumtiv să transmită alela și frecvența alelei obligatorii (X/p)

Puterea de excludere = probabilitatea de excludere a unui bărbat fals acuzat.

Probabilitatea de paternitate = probabilitatea ca tatăl prezumptiv să fie tatăl biologic al copilului.

Determinarea paternității când unul dintre părinți nu este disponibil pentru examinare

În asemenea cazuri tatăl poate cere o dovadă concludentă de atestare a paternității asupra copilului, deși mama este inaccesibilă. Este posibilă deci, determinarea alelelor STR, doar la tatăl prezumptiv și la copil. Tabelul nr.4 prezintă un asemenea caz. Se observă că în cazul tuturor alelelor determinate, copilul prezintă câte o alelă identică cu una de la tată (allela obligatorie). Deși nu se cunoaște constituția genetică a mamei, posibilitatea de coincidență a existenței celor 9 allele obligatorii între tată și copil este extrem de mică. Metodele de calcul folosite sunt aceleași ca si în cazul cunoașterii alelelor cu care participă mama la constituția genetică a copilului. Pe această bază, probabilitatea de paternitate în cazul din Tabelul 4 este de 99,9987%.

Cunoașterea constituției genetice a mamei nu implică folosirea datelor obținute din aceasta la calculul probabilității de paternitate. Deci imposibilitatea de identificare a mamei, face totuși posibilă stabilirea paternității cu mare certitudine. Același raționament se poate aplica și în cazul cunoașterii alelelor prezente la mamă și copil (tată inaccesibil), în situațiile în care trebuie stabilită mama prezumptivă. Acest din urmă caz este însă extrem de rar cerut de organele de justiție.

TABEL 4. Exemplu de examinare a unei paternități când mama nu este disponibilă

Loci	Mama	Copil	Allela obligatorie	Tatăl prezumptiv	p	RMNE	X	PI
CSF1PO	?	11, 12	**12**	11, 12	0,3313	0,5520	0,5	1,5092
TPOX	?	8, 11	**8**	8, 8	0,5091	0,7587	1	1,9642
TH01	?	6, 10	**10**	6, 10	0,0884	0,2391	0,5	5,6561
D16S539	?	8, 11	**11**	11, 11	0,3170	0,5330	1	3,1545
D7S820	?	10, 10	**10**	10, 10	0,2621	0,4548	1	3,8153
D13S317	?	8, 11	**11**	9, 11	0,3231	0,5412	0,5	1,5475
F13A01	?	5, 6	**5**	5, 7	0,1015	0,1923	0,5	4,9261
FESFPS	?	12, 11	**11**	10, 11	0,3502	0,5768	0,5	1,4277
vWA	?	15, 16	**16**	16, 16	0,2439	0,4133	1	3,9866
Valori combinate						**$10{,}22 \times 10^{-5}$**		**78158,33**

p = frecvența alelei obligatorii conform datelor proprii pentru România
RMNE = proporția de indivizi din populație care pot avea alela obligatorie și deci nu pot fi excluși $[p^2 + 2p(1 - p)]$
X = probabilitatea ca tatăl prezumptiv să transmită alela obligatorie
PI = indicele de paternitate = raportul dintre probabilitatea ca tatăl prezumtiv să transmită allela și frecvența alelei obligatorii (X/p)
Puterea de excludere= 99,9897% (probabilitatea de excludere a unui bărbat fals acuzat).
Probabilitatea de paternitate = 99,9987% (probabilitatea ca tatăl prezumptiv să fie tatăl biologic al copilului).

Determinările de filiație

Există situații în care solicitantul pentru determinarea filiației cere o dovadă de certitudine dacă tatăl decedat este tatăl său biologic. Pentru aceasta este necesară deducerea constituției genetice a tatălui pe baza constituției genetice a copiilor săi biologici siguri. În exemplul înfățișat în tabelul nr.5, pentru a determina constituția genetică a tatălui prezumptiv al solicitantului, au fost analizate amprentele ADN pentru următoarele persoane:

1-amprenta ADN a solicitantului;
2-amprenta ADN a mamei solicitantului;
3-amprenta ADN a unei fiice a tatălui prezumptiv, concepută cu prima soție, alta decât mama solicitantului;
4-amprenta ADN a celei de a doua fiice a tatălui prezumptiv, concepută cu a doua soție, care este mama certă a solicitantului.

Prin analiza alelelor la cei 4 subiecți s-a putut deduce constituția genetică posibilă a tatălui prezumptiv. Comparând această constituție genetică cu cea a solicitantului s-a putut deduce foarte clar că tatăl prezumptiv este exclus de la paternitate.

După cum se observă din analiza alelelor la subiecții investigați și din analiza alelelor posibile ale tatălui prezumptiv, din cei 8 loci analizați, alela obligatorie prezentă la solicitant (alela moștenită sigur de la tată), nu coincide în 5 loci cu vreuna din alelele posibile ale tatălui. Constituția genetică a tatălui prezumptiv a fost dedusă din constituția genetică a doi dintre descendenții siguri ai acestuia. Deci, tatăl prezumptiv luat în studiu, nu este tatăl biologic al solicitantului.

Tabelul 4 ilustrează, pe baza arborelui genealogic al familiei, mult mai clar concluziile obținute din acest test.

TABEL 4. Exemplu de examinare a unui caz de stabilire a filiației când tatăl prezumptiv nu este disponibil

Loci	Mama P.M.	Copil P.A.	P.D. Fiica tatălui prezumptiv cu I-a soție	Tatăl Constituția genetică posibilă	Allela obligatorie pentru P.H.	Solicitant determinare filiație P.H.
CSF1PO	12, 12	12, 11	10, 11	10, 11, 11	**14**	12, 14
TPOX	9, 10	9, 11	8, 11	8, 11, 11	**9**	9, 9
TH01	6, 7	7, 9	6, 9	6, 9, 9	**10**	6, 10
D16S539	11, 14	11, 13	11, 13	11, 13, 13	**12**	11, 12
D7S820	10, 11	10, 9	9, 9	9, 9, 9	**10**	10, 10
D13S317	10, 13	13, 9	11, 12	9, 11, 12	**11**	13, 11
F13A01	5, 7	7, 6	7, 8	6, 7, 8	**7**	5, 7
vWA	14, 17	14, 17	17, 18	17, 17, 18	**18**	14, 18

Subiecții testului: Mama: P.M.
Copilul sigur al cuplului: P.A.
Copilul tatălui cu I-a soție: P.D.
Solicitant determinare filiație: P.H.

Calculul probabilității de coincidență (CP) pentru identificarea de persoană

Statistica pentru „Probabilitatea de coincidență“ calculată pentru identificarea de persoană este comparabilă cu calcularea PI. CP este proporția de indivizi care poate contribui cu toate alelele pe care le posedă și astfel nu poate fi exclusă sau este inclusă fals.

Formula pentru CP al unui singur locus este: „2pq“ dacă în acest locus alelele sunt diferite (heterozigote), sau „$p^2 + 2p(1\text{-}p)$“ într-un caz homozigot, unde „p“ este frecvența primei alele, iar „q“, frecvența celei de a doua alele, din locusul în cauză. Valorile combinate pentru mai mulți loci se calculează prin produsul CP individuale.

În tabelul nr.6 prezentăm un caz de criminalistică și modul în care se calculează valoarea CP.

Pe baza constituției genetice în cei 9 loci analizați reiese că alelele probei 104P3 și 104p5 (fire de păr recoltate de la victimă și respectiv pete de sânge de pe cămașa aparținâmd victimei), coincid în proporție de 100% cu genele identificate la probele 104P4 și 104P7 (fire de păr ridicate de pe haina aparținând suspectului T.M. și respectiv pete de sânge de pe pantalonii aparținând suspectului T.M.). Probabilitatea de coincidență cu un alt individ din populație luat întâmplător, adică probabilitatea ca o probă întâmplătoare să coincidă cu amprenta ADN a probelor 104P3, 104p4, 104p5 și 104p7, este de 1 la 160 milioane de indivizi. Alelele identificate la probele 104P1 și 104P2 (fire de păr recoltate de la T.M. și respectiv fire de păr recoltate de la G.T.) nu coincid cu probele 104P3, 104P4, 104P5 și 104P7. În concluzie, petele de sânge prezente pe pantalonii aparținând suspectului T.M. (proba 104P7) provin de la victima B.V.(probele 104P3 și 104P5) cu o probabilitate de coincidență cu o altă probă întâmplătoare de 1 la 160 milioane de indivizi. Firele de păr recoltate de pe haina aparținând suspectului T.M. (proba 104P4) aparțin, de asemenea, victimei.

FRECVENȚA ALELELOR PENTRU LOCII DETERMINAȚI CU „GenePrint® STR System“ (Promega, SUA), ÎN ROMÂNIA

Funcția de bază a tuturor terstelor medico-legale, fie că este vorba de teste de paternitate sau de identificare, este de a exclude numărul maxim de indivizi posibili. Calculele statistice necesare includ și frecvențele populaționale ale alelelor determinate. Prezentăm mai jos profilul genotipic pentru populația României pentru cei 9 loci din „*GenePrint*® STR System“: CSF1PO, TPOX, TH01, F13A01, FESFPS, vWA, D16S539, D7S1179 și D13S317. Populația luată în studiu de

TABEL 6. Exemplu de examinare a unui caz de identificare de persoană

Loci	Proba 104P1	Proba 104 P2	Proba 104 P3	Proba 104 P4	Proba 104 P5	Proba 104 P7	p frecvența primei allele	q frecvența celei de-a II allele	**Formula**	**Frecvența populațională**
CSF1PO	11,12	9,12	**10,12**	**10,12**	**10,12**	**10,12**	0,2704	0,3401	2pq	0.1839
TPOX	11,11	11,12	**8,8**	**8,8**	**8,8**	**8,8**	0,5123	0,5123	p^2+ 0,01p(1-p)	0.2669
TH01	6,9	6,9	**8,9**	**8,9**	**8,9**	**8,9**	0,1296	0,1666	2pq	0.0431
D16S539	10,11	11,11	**11,12**	**11,12**	**11,12**	**11,12**	0,3114	0,2663	2pq	0.1658
D7S820	11,12	10,10	**10,10**	**10,10**	**10,10**	**10,10**	0,2654	0,2654	p^2+ 0,01p(1-p)	0.0723
D13S317	8,12	9,13	**9,12**	**9,12**	**9,12**	**9,12**	0,0758	0,2602	2pq	0.1408
F13A01	5,6	6,7	7,7	7.7	7,7	7,7	0,3150	0,3150	p^2+ 0,01p(1-p)	0.1013
FESFPS	11,12	11,12	**11,12**	**11,12**	**11,12**	**11,12**	0,3289	0,1954	2pq	0.1285
vWA	17,17	14,16	**16,17**	**16,17**	**16,17**	**16,17**	0,2340	0,2865	2pq	0.1340
Valori combinate **Probabilitate de coincidență**										**6,22 x 10^{-9}** **1 la 160 milioane**

104P1 - Fire de păr recoltate de la primul suspect T.M.
104P2 - Fire de păr recoltate de la al doilea suspect G.T.
104P3 - Fire de păr recoltate de la victima B.V.
104P4 - Fire de păr recoltate de pe haina aparținând suspectului T.M.
104P5 - Pată de sânge recoltată de pe cămașa victimei B.V.
104p7 - Pată de sânge recoltată de pe pantalonii aparținând suspectului T.M.

noi provine din diferite regini ale României, numărul total de indivizi de la care s-au analizat alelele STR a fost de 383, iar frecvența acestora este redată în tabelele 7, 8 și 9.

TABEL 7. Frecvența alelelor pentru locii CSF1PO, TPOX și TH01, în populația României

CSF1PO			TPOX			TH01		
Total probe 382			Total probe 376			Total probe 378		
Alela	**FA**	**NA**	**Alela**	**FA**	**NA**	**Alela**	**FA**	**NA**
6	0	0	**6**	0	0	**5**	0,0026	2
7	0,0104	8	**7**	0	0	**6**	0,2460	186
8	0,0039	3	**8**	0,5212	392	**7**	0,1521	115
9	0,0237	25	**9**	0,1130	85	**8**	0,1097	83
10	0,2801	214	**10**	0,0531	40	**9**	0,1746	132
11	0,3075	235	**11**	0,2765	208	**9,3**	0,3108	235
12	0,2892	221	**12**	0.0319	24	**10**	0,0039	3
13	0,0641	49	**13**	0,0039	3	**11**	0	0
14	0,0104	8	**Toate**	**1,0000**	**752**	**Toate**	**1,0000**	**756**
15	0,0013	1						
Toate	**1,0000**	**764**						

FA - Frecvența alelelor; NA - Număr alele

TABEL 8. Frecvența alelelor pentru locii D16S539, D7S820 și D13S317, în populația României

D16S539			D7S820			D13S317		
Total probe 382			Total probe 383			Total probe 378		
Alela	FA	NA	Alela	FA	NA	Alela	FA	NA
5	0	0	6	0	0	5	0,0052	4
6	0	0	7	0,0130	10	8	0,1164	88
7	0	0	8	0,1057	81	9	0,0687	52
8	0,0078	6	9	0,1527	117	10	0,0621	47
9	0,0968	74	10	0,2689	206	11	0,3055	231
10	0,0654	50	11	0,2663	204	12	0,3068	232
11	0,2212	169	12	0,1618	124	13	0,0992	75
12	0,3089	236	13	0,0300	23	14	0,0330	25
13	0,2591	198	14	0,0013	1	15	0,0026	2
14	0,0405	31	**Toate**	1,0000	766	**Toate**	1,0000	756
15	0	0						
Toate	**1,0000**	764						

FA - Frecvența alelelor; NA - Număr alele

TABEL 9. Frecvența alelelor pentru locii F13A01, FESFPS și vWA în populația României

F13A01			FESFPS			vWA		
Total probe 376			Total probe 368			Total probe 370		
Alela	**FA**	**NA**	**Alela**	**FA**	**NA**	**Alela**	**FA**	**NA**
3,2	0,0106	8	**7**	0,0611	45	**11**	0	0
4	0,1263	95	**8**	0,0665	49	**12**	0	0
5	0,1848	139	**9**	0,0380	28	**13**	0,0027	2
6	0,3058	230	**10**	0,2527	186	**14**	0,0878	65
7	0,3058	230	**11**	0,3396	250	**15**	0,1621	120
8	0,0119	9	**12**	0,1725	127	**16**	0,1986	147
9	0,0053	4	**13**	0,0625	46	**17**	0,3013	223
10	0	0	**14**	0,0067	5	**18**	0,1797	133
11	0,0053	4	**Toate**	**1,0000**	**736**	**19**	0,0554	41
12	0,0053	4				**20**	0,0121	9
13	0,0026	2				**21**	0	0
14	0,0159	12				**Toate**	**1,0000**	**740**
15	0,0132	10						
16	0,0066	5						
Toate	**1,0000**	**752**						

FA - Frecvența alelelor; NA - Număr alele

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

"*The Arabidopsis Genome Initiative*" (2000) *Analysis of the genome sequence of the flowering plant* ***Arabidopsis thaliana***, Nature 408:796-812.

Adachi Y., Kas E., Laemmli U. (1989) *Preferential, cooperative binding of DNA topoisomerase II to scaffold-associated regions*, EMBO J. 8:3997-4006.

Adams M.D. et al. (2000) *The Genome Sequence of* ***Drosophila melanogaster***, Science 287:2185-2195.

Agrawal S.B. (1996) *Cytogenetical studies in* ***Chlorococcales*** *and* ***Volvocales****: a review*, (in:) Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae, Ed. Chaudhary B.R., Agrawal S.B., SPB Acad. Publ. Amsterdam p. 51-71.

Agrawal S.B., Chaudhary B.R. (1996) *Chrysophyte cytology: compilation and evaluation*, (in:) Cytology, Genetics and Molecular Biology of Algae, Ed. Chaudhary B.R., Agrawal S.B., SPB Acad. Publ. Amsterdam p. 173-191.

Aimi T., Yamada T., Murooka Y. (1993) *Nucleotide Sequences of BstUI Repetitive Elements from nuclear DNA of* ***Chlorella ellipsoidea*** *C-87*, In J.Fermentation and Bioengineering 76(4):333-335.

Akama K., Nass A., Junker V., Beier H. (1997) *Characterization of nuclear tRNA(Tyr) introns: their evolution from red algae to higher plants*, FEBS Letters 417(2):213-8.

Akerib C., Meyer B. (1994) *Identification of X chromosome regions in* ***Caenorhabditis elegans*** *that contain sex-determination signal elements*, Genetics 138:1-21.

Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J.D. (1989) *Molecular biology of the cell*, 2nd ed., Garland Publishing, New York.

Altwegg M., Hickman-Brenner E. (1989) *Ribosomal RNA gene restriction pattern provide increased sensitivity for typing* ***Salmonella typhi*** *strains*, J. Infect. Dis. 160(1):145-149.